

VERGLEICH DER MIKROHETEROGENITÄT VON
IM BLUT ZIRKULIERENDEM UND
INTRATHYREOIDALEM THYREOGLOBULIN

CHRISTOPH JÜRGENS

1987

Disbui. München





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554617_0077

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORSTAND: PROFESSOR DR. E. BUCHBORN

VERGLEICH DER MIKROHETEROGENITÄT
VON IM BLUT ZIRKULIERENDEM
UND INTRATHYREOIDALEM
THYREOGLOBULIN

DISSERTATION
ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von
CHRISTOPH JÜRGENS

aus
BERLIN

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. K. Horn
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. E. Buchborn Prof. Dr. med. D. Engelhardt
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. R. Gärtner Dr. med. W. Greil
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	10.12.1987

Das Buch ist ein Werk, das ich
mit großer Freude und
Vielmut geschrieben habe.
Es ist ein Werk, das ich
mit großer Freude und
Vielmut geschrieben habe.

Es ist ein Werk, das ich
mit großer Freude und
Vielmut geschrieben habe.
Es ist ein Werk, das ich
mit großer Freude und
Vielmut geschrieben habe.

Meinen Eltern

Es ist ein Werk, das ich
mit großer Freude und
Vielmut geschrieben habe.
Es ist ein Werk, das ich
mit großer Freude und
Vielmut geschrieben habe.

Bei Herrn Prof. Dr. Horn, Herrn Dr. Gärtner
und Herrn Dr. Greil mochte ich mich für
die Überlassung des Themas und die
Unterstützung bei der Anfertigung meiner
Arbeit bedanken.

Frau Kubiczek und allen anderen
Mitarbeiterinnen des Labors 174
danke ich für die angenehme
Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Frau Haag danke ich für Ihre Bemühungen
bei der Anfertigung meiner Abbildungen.

Herrn Henner danke ich für seine
freundlichen Hilfeleistungen bei
technischen Problemen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
2. MATERIAL UND METHODEN.....	8
2.1. Verwendete Substanzen.....	8
2.2. Material und Geräte.....	9
2.3. Proben.....	10
2.3.1. TG aus OP Material.....	10
2.3.2. Serumproben.....	11
2.4. IEF.....	14
2.4.1. Prinzip.....	14
2.4.2. Praktische Durchführung.....	15
2.4.2.1. Herstellung der Agarosegele.....	15
2.4.2.2. Durchführung der IEF.....	17
2.4.3. Auswertung der Mikroheterogenität.....	21
2.5. Molekulargewichtsbestimmung mittels Dichtegradientengel Elektrophorese.....	22
2.6. Proteinblotting.....	26
2.6.1. Prinzip.....	26
2.6.2. Praktische Durchführung.....	27
2.6.2.1. Diffusions-Methode.....	28
2.6.2.2. Proteinblotting durch Puffersog.....	29
2.6.2.3. Elektroblothing.....	32
2.6.3. Versuch zur Quantifizierung des Transfers.....	36

2.7. Nachweis von TG mit spezifischen Antikörpern.....	37
2.7.1. Prinzip	37
2.7.2. Ablauf.....	38
2.7.3. Austestung der optimalen AK-Konzentrationen.....	41
3. ERGEBNISSE.....	43
3.1. Vergleich der verschiedenen Transferbedingungen.....	43
3.2. Vergleich der Nachweismethoden.....	46
3.3. Mikroheterogenität von reinem TG.....	49
3.4. Molekulargewichtsbestimmung von reinem TG.....	51
3.5. Mikroheterogenität von TG aus dem Serum von Patienten mit benignen Schilddrüsenerkrankungen.....	56
3.6. Mikroheterogenität von TG aus dem Serum von Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom.....	64
3.7. Molekulargewichtsbestimmung von TG aus dem Serum von Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom.....	69
4. DISKUSSION.....	70
4.1 Diskussion der Methoden.....	70
4.1.1. IEF.....	70
4.1.2. Proteinblotting.....	71
4.1.3. Nachweisreaktionen.....	76
4.2. Intrathyreoidales TG.....	77
4.3. Extrathyreoidales TG.....	80
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	86
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	89
7. LEBENS LAUF	100

ABKÜRZUNGEN

A. A. :	Autonomes Adenom
AK:	Antikörper
BSA:	Bovines Serum Albumin
IEF:	Isoelektrische Fokussierung
K. K. :	Kalter Knoten
M. B. :	Morbus Basedow
NZ:	Nitrozellulose
PAA:	Polyacrylamid
PBS:	0,05 M Na Phosphatpuffer pH 7,4
PI:	Isoelektrischer Punkt
POD:	Peroxydase
TG:	Thyreoglobulin
dig:	desialisiertes TG
ZB:	Zeta-Bind



1. EINLEITUNG

Die Schilddrüse besteht zu ca. 75 % aus dem Glykoprotein Thyreoglobulin (TG), dem Syntheseort und Speicherprotein der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4) (50). Es hat ein Molekulargewicht von 660 000 und einen Sedimentationskoeffizienten von 19 S. Es besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 330 000 und einem Sedimentationskoeffizienten von 12 S (66).

Synthese der Proteinstruktur

Die Synthese der Primärstruktur, also der Aminosäuresequenz, findet an den Polyribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Der Aminosäuresequenz kommt eine besondere Bedeutung für die Funktion des TGs zu, da es sich gezeigt hat, daß von den 120 im TG enthaltenen Tyrosinen nur 25-30 Jod binden. Von diesen wiederum sind nur 6 - 8 in der Lage Schilddrüsenhormone zu bilden (48). Es wird daher vermutet, daß eine ganz spezifische Struktur des TG notwendig ist, damit zum einen das Jod an die Tyrosine gebunden werden kann und zum anderen diese Aminosäuren zu Hormonen gekoppelt werden können (13,18,20). Außerdem wurde festgestellt, daß zunächst immer ganz bestimmte Tyrosine jodiert werden (54). Dieses könnte bezwecken, daß auch bei Jodmangel ausreichend Hormone gebildet werden können (21,53). Von zwei Thyroxin- und einer vorwiegenden Thyroninbindungsstelle konnten die Aminosäuresequenzen aufgeklärt werden (47,49,52,56,57,73,). Sie scheinen bei verschiedenen Wirbeltieren identisch zu sein (74).

Glykolisierung

Der Zuckeranteil des TG beträgt ca. 10 % (66). Nach der Synthese des Proteinanteils an den Polyribosomen des rauen ER sind die Glykolisierung und Iodierung des Moleküls die nächsten entscheidenden Schritte im TG-Stoffwechsel. Eine vollständige Glykolisierung gilt als Voraussetzung für eine Freisetzung des TG in die Follikel und für die anschließende Iodierung (23). Es gibt Hinweise darauf, daß unzureichend glykolisierte TGs in der Hormonsynthese beeinträchtigt sind. Des weiteren gibt es experimentelle Ergebnisse, wonach TGs aus maligne entarteten Thyreozyten in ihrem Zuckeranteil verändert sein sollen (59,63,94,95).

Die ersten Zuckeranteile, Mannose und N-Acetyl-Glukosamin, werden wahrscheinlich schon am rauen ER eingebaut. Die weiteren folgen während der Migration zum glatten ER und durch den Golgi Apparat (66).

Es sind bis jetzt vier verschiedene Kohlehydratketten (A-D) im TG-Molekül entdeckt und zum Teil schon näher charakterisiert worden:

Die A-Kette mit einem Molekulargewicht von 1.800 besteht aus mindestens fünf Molekulan Mannose und zwei N-Acetyl-Glukosaminen, wobei eines an Asparagin gebunden ist (1). Humanes TG enthält 8 A-Ketten. Innerhalb einer Spezies wird ein unterschiedlicher Mannose Gehalt in der A-Kette beschrieben, während der Gehalt an Glukosaminen konstant bleibt (1,90).

Die wesentlich komplexer aufgebaute B Kette mit einem Molekulargewicht von 2.100-3.300 besteht neben Mannose und Glukosamin noch aus Neuraminsäure, Galaktose und Fucose (2). Die endständige Neuraminsäure wird als letzter Zuckeranteil bei der Lösung des TG von der endoplasmatischen Membran und somit kurz vor der Sekretion in das Follikellumen eingebaut (60,62). Auch die B Kette, wie die A-Kette über Asparagin mit dem übrigen TG-Molekül verbunden, zeigt eine Variabili-

tät der Zuckeranteile, nur Mannose bleibt mit drei Molekülen pro Kette konstant (1,93). Humanes TG enthält 22 B-Ketten (50).

Die noch wenig untersuchte C Kette besteht hauptsächlich aus Galaktosamin und ist über Serin oder Threonin an TG gebunden (1).

Die an Serin gebundene D Kette besteht vorwiegend aus dem Disaccharid Glukuronsäure/Galaktosamin. Daneben enthält sie aber noch Xylose und Galaktose. Sie hat ein Molekulargewicht von 5.750 (87).

Jodierung

Die Jodierung des TG findet nach Exozytose des Moleküls in das Follikellumen an der apikalen Plasmamembran der Thyrozyten statt. Es handelt sich also um einen extrazellulären Prozeß, der von einer membranständigen Peroxydase und Wasserstoffperoxyd katalysiert wird (24). Jod wird mit Hilfe eines aktiven Transportes in das Follikellumen geschafft (67). Es gibt Hinweise dafür, daß jedes TG-Molekül in aufeinander folgenden Schritten jodiert wird (58). Zunächst findet eine sofortige Jodierung des neusynthetisierten TG bei der Exozytose statt, danach kommt es zu einer verzögerten Jodierung des gespeicherten TG (58). Außerdem scheint die Viskosität des TG-Moleküls auf diesen Prozeß Einfluß zu haben (88).

Im Gegensatz zu den bisherigen Erkenntnissen über die Jodierung von TG stehen die Ergebnisse einer Arbeitsgruppe, die eine Jodierung auch außerhalb der Basalmembran im Follikel beschreibt (68).

Hormonfreisetzung

TG wird durch Pinozytose aus den Follikeln wieder in die Zelle aufgenommen (40,38a). Da das neusynthetisierte, niedrig jodierte TG an den Mikrovilli der apikalen Membran anliegt, wird vermutet, daß die Pseudopodien Kolloid aus 1-2 μm Entfernung von der Basalmembran aufnehmen, um so dem Follikel selektiv hoher jodiertes TG zu entnehmen (26). Nach der Pinozytose verschmelzen die Vesikel mit Lysosomen zu sekundären Lysosomen. Auf diese Weise kommt das TG mit verschiedenen Proteasen in Kontakt, die das Molekül nacheinander aufspalten und so die Hormone aus ihren Peptidbindungen freisetzen (65,96). Die Geschwindigkeit der Hydrolyse scheint vom Jodgehalt des TG-Moleküls abhängig zu sein (28,29).

Mikroheterogenität von TG

Eine Möglichkeit, Aussagen über den Jodierungsgrad und dem Zustand des Kohlehydratanteils des TG zu machen, bietet die Isoelektrische Fokussierung (IEF). Bei einer IEF stellt sich das TG mit seiner spezifischen Mikroheterogenität von sechs Banden von pH 4,20 bis 4,60 dar. Die Mikroheterogenität ist ein für Glykoproteine spezifisches Charakteristikum. Bei Untersuchungen von TGs mit verschiedenem Jodierungsgrad mittels IEF zeigte es sich, daß die Anzahl der Banden und ihre isoelektrischen Punkte (PI) unverändert blieben. Allerdings änderte sich die Stärke der Banden zueinander. Bei hoch jodiertem TG sind die TG-Banden mit kleinerem PI kraftiger dargestellt, bei TG mit niedrigem Jodgehalt stellten sich die Banden im alkalischen Bereich deutlicher dar. (4)

Demgegenüber beeinflusst eine Veränderung im Zuckeranteil des TG die PIs der Banden. Nach Abspaltung der endständigen Neuraminsäure stellen sich die Banden zwischen pH 4,60 und 4,90 dar (4).

Thyreoglobulinspiegel im Serum

Bis vor einiger Zeit war man der Ansicht, daß das TG nur intrazellulär in den Thyreozyten oder innerhalb der Schilddrüsenfollikel vorkommt. Erst seitdem man mittels eines RIA auch sehr geringe Mengen TG nachweisen kann, weiß man, daß dieses Glykoprotein in Konzentrationen bis ca 10 ng/ml im Serum fast eines jeden Gesunden vorkommt. Normalwerte für TG schwanken je nach Autor, was vermutlich an der Verwendung verschiedener Methoden liegt (39). Unklar ist die Frage der Freisetzung des TG aus den Thyreozyten oder aus dem Follikelumen. Von einigen Autoren wird die Meinung vertreten, daß es sich bei der Freisetzung des TG aus der Schilddrüse in das Serum um einen gesteuerten Sekretionsprozeß handelt (38b). Es gibt experimentelle Ergebnisse, die belegen, daß TSH sowohl die Synthese von mRNA für TG der Thyreozyten über das cAMP steigert, als auch die Jodaufnahme, die Jodierung und die Hormonfreisetzung (3,9,10,78). Es wird von einigen Arbeitsgruppen vermutet, daß das TSH auch einen Freisetzungsmechanismus für TG steuert, da nach Gabe von bovinem TSH beim Menschen der TG-Spiegel im Serum nach 24 h ansteigt (91).

Messungen der TG-Spiegel bei Patienten mit verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen haben häufig erhöhte Werte ergeben. Klinische Relevanz hat das TG als Tumormarker für die Nachsorge von Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen nach totaler Thyreoidektomie erlangt. Ein Ansteigen des TGs nach vollständiger Entfernung der Schilddrüse und anschließender Radiojodtherapie spricht für eine Metastasierung der Grunderkrankung. Dabei hat sich das TG für die Entdeckung von Fernmetastasen als sensitiv erwiesen, während der Einsatz für die Diagnose von Lokalrezidiven noch fraglich ist. Nicht möglich ist der Einsatz von TG primär zur Tumorsuche. (72).

Die einzigen Ergebnisse, die sich, allerdings mit einer indirekten Meßmethode, mit dem Jodgehalt von Serum-TG auseinandersetzen, stammen von Schneider et al. Nach ihren Untersuchungen ist Serum-TG sowohl bei Patienten mit benignen und malignen Schilddrüsenerkrankungen niedrig jodiert, als auch bei Normalpersonen (81). Bei Ratten bewirkt die Verabreichung von TSH nicht nur eine Erhöhung des TG-Spiegels, sondern auch eine Zunahme des Jodgehaltes des extrathyreoidalen TGs. Die Ergebnisse werden dahingehend interpretiert, daß TSH selektiv hochjodiertes, in den Follikeln gespeichertes TG freisetzt. Besteht kein Einfluß von TSH, wird neusynthetisiertes, niedrig jodiertes TG in die Zirkulation abgegeben (82). Andere Autoren können diesen direkten Zusammenhang zwischen TSH und TG in ihren Untersuchungen nicht nachvollziehen und nehmen eine autonome TG Freisetzung bei Patienten mit einer Knotenstruma an (30) oder bezweifeln zumindest eine abschließliche Kontrolle des Serum TG durch TSH (27). Aufgrund histologischer Untersuchungen wird von einer Arbeitsgruppe die Meinung vertreten, daß bei einer Struma vereinzelt auftretende Nekrosen von Follikeln für ein intermittierendes Freisetzen von TG verantwortlich ist. Ebenso kann das Einwachsen von Tumorgewebe in Schilddrüsenfollikel eine Freisetzung von TG bewirken (31).

Zielsetzung der Arbeit

Die geringe Menge an Ausgangsmaterial hat sich bis jetzt als Hemmnis für aussagekräftige Untersuchungen über das extrathyreoidale TG erwiesen. Bis jetzt liegen nur Ergebnisse einer Arbeitsgruppe vor, die niedrig jodiertes TG bei Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen beschreiben (81).

Die Darstellung der Mikroheterogenität von TG mittels IEF läßt indirekt Rückschlüsse über den Jodgehalt des Glykopro-

teins zu. Gleichzeitig erhält man Hinweise auf den Neuraminsäuregehalt des Molekuls.

Ziel dieser Arbeit war es, die Mikroheterogenität von TG aus dem Serum von Patienten mit benignen und malignen Schilddrüsenerkrankungen mit der bekannten Mikroheterogenität von intrathyreoidalem TG zu vergleichen. Dabei wurde zum einen der Frage nachgegangen, ob TG im Serum immer niedrig jodiert ist, wie von Schneider et al. beschrieben (81). Zum anderen wurde untersucht, ob es typische Veränderungen in der Mikroheterogenität des Serum TG bei bestimmten Schilddrüsenerkrankungen gibt, z.B. ein spezifisches Tumor TG bei malignen Schilddrüsentumoren.

Um neben intrathyreoidalem TG auch die Mikroheterogenität von Serum-TG untersuchen zu können, wurde die IEF mit dem Proteinblotting kombiniert. Dabei werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine immobilisierende Matrix transferriert, auf der sie dann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können. Auf diese Weise konnte die Sensitivität der Methode soweit verbessert werden, daß Patientenserum mit einer TG Konzentration bis zu 200 ng/ml untersucht werden konnten. Gleichzeitig konnte man wegen der Spezifität der verwendeten Antikörper auf Isolierungsschritte verzichten und das Serum in der Regel ohne weitere Vorbereitungen direkt als Probenmaterial verwenden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendete Substanzen

Antikörper

Anti TG-AK vom Meerschweinchen

Anti MS IgG + POD Paesel GmbH & Co.

Anti-MS-IgG + Biotin BA-7000

Avidin-D + POD, A 2004, beide Vector Laboratories

Enzyme

Neuraminidase

Pronase E 70000 PUK/g Merck 7433

Trypsinhemmer

Trasylol

Substanzen für Färbereaktion

3-Amino-9-Ethylcarboxol

4-Chlor-1-Naphthol

Serva Violett 17, Serva 35072

LKB

Ampholine pH 4,0-6,5; LKB 1818-116

Pharmazia

Agarose IEF, Code No. 17 0468 01

Alle übrigen, nicht einzeln aufgeführten Substanzen stammen entweder aus der Hausapotheke oder von der Firma Merck

2.2. Material und Geräte

LKB

Zubehörsatz zum Gießen von Kapillargelen, 2117 701

Gelbondfilme 124 mm x 258 mm, 1850-101

Feuchtkammer 2117-110

Elektrodenstreifen 2117 106

Spannungsgerät

Elektrophoresekammer mit Kühlgerät

Transphor Electroblothing Unit LKB 2005

Millipore

Nitrozellulose

Pharmacia

Entfärbekammer

Destainer Power Supply DPS

Gel Electrophoresis Apparatus GE - 2/4

2.3. Proben

2.3.1. TG aus OP-Material

Als Referenz zum Vergleich mit extrathyreoidalem TG wurde aus OP-Material gewonnenes TG verwendet.

Das Material wurde wie folgt gereinigt und isoliert:

Schilddrüsengewebe wurde direkt nach der OP eingefroren. Das gefrorene Gewebe wurde mit einem Mikrotom fein zerschnitten und in einem Erlenmeyer Kolben geschüttelt. Dabei wurde das Kolloid aus den Schnitten herausgelöst. Als Elutionspuffer wurde 0,05 M Phosphatpuffer mit 0,15 M NaCl verwendet. Als Enzymblocker, um ein Aufspalten des TGs durch zelleigene Enzyme zu verhindern, wurde 2mM Diisopropylfluorophosphat hinzugegeben. Nach 2-3 Std. wurde das Material für 15 min. in einer Klinikzentrifuge mit 4000 Upm zentrifugiert.

In einigen Versuchen wurde der Überstand des Schilddrüsen eluates als Probenmaterial für Elektrophoresen und IEF eingesetzt.

Ansonsten wurde der Überstand wie folgt weiter gereinigt:

Der Überstand wurde auf eine ACA 22 Säule gegeben und mit 0,2 M Tris-Phosphatpuffer, pH 8,6, bei einer Flußrate von 15 ml/h eluiert. Die aus der Chromatographie gewonnenen Proben wurden in Kollodiumhulsen durch Vakuumdialyse konzentriert. Dabei wurden sie gegen 0,05 M Ammoniumacetat dialysiert. Als letztes wurden die Proben entsalzt und mit einer Vakuumpumpe gefriergetrocknet.

Die Gelchromatographie hat 6 Fraktionen ergeben. Versuche zur Feststellung der Reinheit des gewonnenen TG haben gezeigt, daß die 4. Fraktion ausschließlich aus TG besteht (Einzelheiten zu den Kriterien der Reinheit des TG und den kurz beschriebenen Isolierungsschritten siehe (4)).

Das in der 4. Fraktion gewonnene TG wurde als Referenz zum Vergleich mit extrathyreoidalem TG eingesetzt.

Die Proben wurden im gefrorenen Zustand aufbewahrt und bei Bedarf in 0,05 M Na-Phosphatpuffer gelöst.

Bei Anwendung des Proteinblottings wurden 5 µg/ml verwendet, bei Direktanfarbung des Gels 5 mg/ml.

2.3.2. Serumproben

Es wurden Seren von Patienten mit malignen und benignen Schilddrüsenerkrankungen verwendet, die mindestens eine TG-Konzentration von 200 ng/ml aufwiesen. Seren mit niedrigeren Spiegeln wurden nicht gesammelt, da mit so geringen Konzentrationen keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Serumproben wurden in Eppendorfigefäßen portioniert und eingefroren.

In der Regel wurden 5 µl Serum ohne vorhergehende weitere Bearbeitung auf das Gel für die IEF aufgetragen.

Seren mit sehr hohen TG-Spiegeln wurden mit Na-Phosphatpuffer auf Werte um 1 µg/ml herunterverdünnt.

Desialisieren von Serumproben:

Desialisieren heißt Abspaltung der endständigen Neuraminsäure aus dem Kohlehydratanteil des TG. Dieses geschieht zur Feststellung, ob sich desialisiertes extrathyreoidales TG genauso in seiner Mikroheterogenität verhält wie desialisiertes intrathyreoidales TG.

Ablauf:

50 μ l Serum
+ 150 μ l 0,1 M Acetatpuffer pH 5,0
+ 50 μ l Neuraminidase
+ 15 μ l Trasylol
werden bei 30°C für 18 Std im Wasserbad inkubiert
Die Reaktion wird mit 50 μ l 0,1 M Glycin, pH 10, gestoppt

Beim Desialisieren findet eine Verdünnung der Ausgangskonzentration um 1:5 statt.

Anreicherung von Serum TG (PEG Fällung):

Ziel dieses Versuches war es, TG im Serum anzureichern. Mit PEG (Polyethylenglycol 6000) sollte TG in einer Serumproteinfraktion ausgefällt werden, um danach wiederum in einem kleineren Volumen gelöst zu werden.

Um feststellen zu können, in welcher Probe das meiste TG gefällt wurde, kam in jede Probe eine bestimmte Menge IG-Tracer.

Ablauf:

500 µl Serum + 50 µl TG Tracer wurden mit

1.) 275 µl 10% PEG = 3,33% PEG

2.) 275 µl 15% PEG = 5% PEG

3.) 275 µl 20% PEG = 6,66% PEG

4.) 275 µl 25% PEG = 8,33% PEG

für eine Stunde bei RT inkubiert.

Danach wurden die Proben 2 min zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und die ausgefallenen Proben wurden mit 50 µl NaCl gespült.

Die Aktivität sowohl des eingesetzten TG Tracers als auch der ausgefallenen Proben wurde gemessen.

Die Proben mit der höchsten Aktivität wurden für die weiteren Versuche eingesetzt.

Die Anreicherung von Serum TG mittels PEG-Fällung ist nicht dafür geeignet die Nachweisgrenze der Methode zu verbessern.

2.4. Isoelektrische Fokussierung

2.4.1. Prinzip

Die IEF ist eine Elektrophorese, die im Gegensatz zu herkömmlichen Elektrophoresen nicht bei einem konstanten pH, sondern mittels eines pH Gradienten ausgeführt wird. Dieser pH-Gradient wird mit Hilfe von Ampholyten, die beim Herstellen des Gels mit in die Agarose gegeben werden, und einer Spannung zwischen zwei Elektroden errichtet und stabilisiert.

Während der IEF sinkt die Leitfähigkeit des Gels mit der Zeit, vor allem zu Beginn der IEF. Dieses geschieht, weil sich die Ampholyte mit der Zeit in dem pH Gradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt ausrichten. Sie wandern, je nach Eigenladung, zur Anode oder zur Kathode, bis sie keine Nettoladung mehr besitzen. Des weiteren zeichnen sich die Ampholyte durch eine große Pufferkapazität aus.

Während des gesamten Ablaufs der IEF wird eine konstante Leistung zugeführt. Für Strom und Spannung werden Maximalwerte eingetragen, die nicht überschritten werden sollen (Einzelheiten zu diesen Werten siehe 2.4.2.2.). Mit der Zeit steigt die Spannung auf den eingegebenen Maximalwert an, der Strom sinkt mit der Zeit. Hierbei ist zu beachten, daß die angegebenen Werte nur für die in dieser Arbeit verwendeten Ampholyte der Firma LKB für den pH Bereich 4,0-6,5 gelten. Schon bei Ampholyten der gleichen Firma, aber mit einem anderen pH Bereich, sind andere Bedingungen für die IEF erforderlich.

Ein auf das Gel aufgetragendes Protein wandert während der IEF in dem pH Gradienten zu seinem isoelektrischen

Punkt, d.h. zu dem Punkt, an dem es keine positive oder negative Nettoladung mehr hat. Der isoelektrische Punkt ist ein sehr spezifischer physikalischer Parameter für ein Protein bzw. Glykoprotein.

2.4.2. Praktische Durchführung

Die Durchführung der IEF auf 0,5 mm dicken 1%igen Agarose gelen besteht aus:

1. Herstellung der Agarosegele
2. der Focussierung
3. Fixieren und Färben der Gele, sofern nicht das Proteinblotting angewandt wird (siehe 2.6.)

2.4.2.1. Herstellung der Agarosegele

Die Herstellung eines Agarosegeles erfordert ca. 60 min Zeit, wobei 30 min zur Abkühlung des Geles benötigt werden. Es hat sich folgender Ablauf bewährt:

1. Herstellung der Gießform aus Grund- und Deckplatte, die mit Hilfe einiger Klammern zusammengehalten werden. Hierbei ist darauf zu achten, daß die Klammern nicht zuviel Druck ausüben, da es ansonsten zu Wölbungen der Glasplatten und somit zu Ungleichmäßigkeiten in der Dicke des Geles kommt. Der als Träger des Gels dienende Gelbondfilm besitzt eine hydrophobe und eine hydrophile Seite, die leicht mit einem Wassertropfen identifiziert werden können. Der Film wird mit der hydrophoben Seite auf die Grundglasplatte gegeben. Auf diese Weise kommt das Gel auf die hydrophile Seite, an die es sich fest anhaftet.
2. Die Gießform und die zum Einfüllen der Agarose notwendige Spritze werden in einem Wärmeschrank bei 70°C für ca. 15 min vorgewärmt. Damit soll erreicht werden, daß die Agarose

zum einen besser in die Gießform hineinläuft und zum anderen in der Spritze nicht schon fest wird

3. Die Agarose läßt sich sehr einfach in einem entsprechend großen Glaskolben in einem Wasserbad herstellen. Die benötigten Substanzen - 180 mg Agarose IEF, 2,2 g Sorbit und 16,6 ml aqua dest. - werden bis auf eine Temperatur von 92-94 °C erhitzt. Bei dieser Temperatur löst sich die Agarose auf. Es empfiehlt sich, den Glaskolben mit einem nicht ganz abschließenden Deckel zu versehen, um das Entweichen von Wasserdampf zu verhindern. Der durch das Erhitzen entstandene Wasserverlust muß jedoch ausgeglichen werden. Man läßt dann die Agaroselosung auf 75 °C abkühlen. Nach Erreichen dieser Temperatur werden 1,4 ml Ampholyte in die Lösung gegeben und schnell verrührt. Man darf die Ampholyte nicht bei höheren Temperaturen in die Lösung geben, da sie ansonsten durch die Hitze denaturiert werden.

4. Die flüssige Agarose muß nun schnell mit der vorgewärmten Spritze unbedingt luftblasenfrei aufgezogen werden, um dann sofort in die etwas schräg aufgestellte Gießform eingespritzt zu werden. Es sollte darauf geachtet werden, daß die flüssige Agarose gleichmäßig wie ein zusammenhängender Film in die Gießform hineinläuft, ohne daß Luftblasen oder Kontinuitätsunterbrechungen auftreten. Die vollständig mit Agarose gefüllte Gießform wird dann zur Abkühlung des Geles ca. 30 min. waagrecht gelagert.

5. Das Gel sollte sich nach dieser Zeit leicht aus der Gießform herausnehmen lassen, indem man einfach nach Entfernen der Klammern vorsichtig die Deckplatte abhebt.

6. Das fertige Gel läßt sich einige Wochen in einer Feuchtkammer bei 5 °C lagern.

Für einen Teil der Experimente war es notwendig, das Gel nach der Fokussierung von seinem Träger herunter zu nehmen. Da die Agarose mit dem Gelbondfilm relativ fest verhaftet ist, läßt sich das Gel nicht ohne Beschädigung von dem Film abnehmen.

Für diese Experimente (siehe 2.6.2.) wurde das Gel direkt auf eine Glasplatte gegossen. Es wurden zwei 124 mm x 120 mm große Glasplatten benutzt. Mit aus selbstklebenden Teflonstreifen bestehenden Abstandshaltern wurden 0,5 mm dicke Gele gegossen, Anleitung wie oben.

2.4.2.2. Durchführung der IEF

Vorbereitung des Gels

Zunächst wird das Gel für 10 min. bei 50°C in einen Wärmeschrank gelegt. Vom Ausgangsgewicht von 22-23 g sollten ca. 1,0-1,2 g verloren gehen. Auf diese Weise wird ein konstantes Gewicht und ein vergleichbarer Wassergehalt der Gele erreicht.

Die Elektrophoresekammer, mit der die IEF durchgeführt wird, besteht hauptsächlich aus einem Block, deren horizontale Oberfläche genau mit der Größe der Gelbond-Filme übereinstimmt. Dieser Block ist einem Kuhlssystem angeschlossen. Das Kühlgerät wird auf 18°C eingestellt.

Zur besseren Orientierung auf den völlig durchsichtigen Agarosegelen werden Schablonen benutzt, die für fast die gesamte Gelfläche eine Zentimeterangabe haben und eine Markierung zum Auflegen der Elektrodenstreifen an den Langseiten der Gele. Schablone und Gel werden mit Hilfe eines Wasserfilms auf den Kuhlblock der Elektrophoresekammer gegeben.

Die Elektrodenstreifen, mit denen die Spannung auf das Gel übertragen werden soll, müssen entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten werden. Anschließend wird mit einer Spritze soviel Anoden- bzw. Kathodenlösung auf die Elektrodenstreifen gegeben, daß diese völlig durchtränkt sind. Hierbei dehnen sich die Elektrodenstreifen aus, eventuell Länge kontrollieren. Danach werden die Streifen in der durch die Markierung der Schablonen vorgegebenen Position auf das Gel gelegt. Hierbei sollten Pinzetten benutzt werden.

Als Elektrodenlösungen werden benutzt:

Anodenlösung: 0,5 M Essigsäure

Kathodenlösung: 0,5 M NaOH

Auftragen der Proben

Mit einer entsprechenden Pipette werden Proben von 5 µl aufgetragen. Es hat sich als praktikabel herausgestellt, die Proben etwa in der Mitte des Gels bei den Zentimeterangaben 4,5-5 der Schablonen in Form eines 8 mm x 5 mm großen Rechteckes aufzutragen.

Nach dem Auftragen der Proben sollte sehr schnell mit der IEF begonnen werden, um ein ungerichtetes Diffundieren der Proben zu verhindern.

Beim Schließen des Deckels der Elektrophoresekammer muß darauf geachtet werden, daß die in diesem Deckel angebrachten Elektroden auf den Elektrodenstreifen des Gels zum Liegen kommen.

Ablauf der Fokussierung

Am Spannungsgerät werden folgende Werte eingestellt:

Spannung: 1500 V

Leistung: 0,625 W/cm Gellänge=15 W bei 24 cm

Strom : 1,25 mA/cm Gellänge=30 mA bei 24 cm

Nach dem Einstellen der Werte kann die Focussierung ge-
startet werden.

Die IEF dauert 90 min.

Strom- und Spannungswerte alle 30 min. kontrollieren und
notieren.

Im Verlauf der IEF steigt die Spannung von etwa 700 V auf
1500 V an, der Strom sinkt von 22 mA auf etwa 9 mA. (Werte
gelten für eine Gellänge von 24 cm und bei Verwendung von
Ampholinen pH 4,0 6,5 der Firma LKB).

Während der IEF kommt es zu Wasseransammlungen an der
Kathode. Diese müssen alle 20-30 min. mit Filterpapieren
oder Papierhandtüchern entfernt werden.

Im Idealfall sollten die 1500 V nach 90 min. erreicht
werden.

Es lassen sich aber auch gute Ergebnisse erzielen, wenn nach
90 min. lediglich 1400 V erreicht werden. In diesem Fall
sollte man ebenfalls die IEF nach 90 min. beenden und nicht
versuchen, durch Erhöhung der Leistung oder durch längere
Focussierzeiten doch noch 1500 V zu erreichen. Falls nur
Werte um 1300 V und niedriger oder die 1500 V schon nach 75
min oder früher erreicht werden, empfiehlt es sich, nach
Storfaktoren zu suchen, z.B.: Feuchtigkeit der Gele, Art der
Proben, Einstellung am Spannungsgerät, Kriechstrom in der
IEF Kammer.

Fixieren und Färben der Gele

In der Regel wurden die Gele nach der IEF in unfixiertem Zustand geblottet (siehe Punkt 2.6.).

Wenn die Gele jedoch direkt nach der IEF gefärbt werden sollten, z.B. beim Austesten neuer IEF-Bedingungen, so wurde folgende Methode verwendet:

Bevor das Gel in 300 ml Fixierlösung getan wird, werden die Elektrodenstreifen entfernt, indem man mit einem Skalpell an der Innenseite der Streifen entlangschneidet und diese mitsamt den abgetrennten Gelteilen verwirft. Als Fixierlösung wurde verwendet: 10 g% Trichloressigsäure, 1 g% Sulfosalicylsäure, beides Firma Merck

Nach 15 min. wird das Gel aus der Fixierlösung genommen und auf ein Filterpapier gelegt. Ein feuchtes und danach etwa vier trockene Filterpapiere werden auf das Gel gelegt und mit einem Gewicht von etwa 1-2 kg auf das Gel gepreßt. Nach wiederum 15 min. werden die Papiere entfernt und das Gel mit einem Föhn getrocknet. Danach kommt das Gel 10 min. in die Färbelösung. Die Färbelösung besteht aus 0,1 g% Serva violett 17, gelöst in Entfärbelösung. Die Entfärbelösung setzt sich zusammen aus 7 Teilen Methanol (96%), 2 Teilen Essigsäure (96%) und 11 Teilen aqua dest. Die Färbelösung muß nach Gebrauch gefiltert werden. Als letztes kommt das Gel in die Entfärbelösung, ca. 2 x 5 min., bis der Hintergrund klar ist, die Ränder müssen jedoch noch deutlich sichtbar sein.

2.4.3. Auswertung der Mikroheterogenität

Beurteilung des Jodgehaltes von TG

Es ist bekannt, daß der Jodgehalt des TGs Einfluß auf die Mikroheterogenität hat. Bei Beibehaltung der PIs der einzelnen Banden ändert sich jedoch die Intensität der Ausprägung der Banden zueinander. Niedrig jodiertes TG mit 3 Atomen Jod/Molekül TG hat seine stärkste Bande bei pH 4,60, die Banden mit niedrigeren PI-Werten sind schwächer ausgeprägt. Mit Anstieg des Jodgehaltes ändert sich das TG-Muster, indem sich die Banden mit niedrigeren PI-Werten intensiver anfärben, gleichzeitig nehmen die Banden mit höheren PI-Werten an Intensität ab (4).

Beurteilung des Neuraminsäuregehaltes

Die Neuraminsäure (Sialinsäure) beeinflusst die PI-Werte der Mikroheterogenität von TG. Desialisieren des TG-Moleküls, d.h., Abspalten der endständigen Neuraminsäure, bewirkt einen Shift der Mikroheterogenität aus dem pH-Bereich 4,20-4,60 in den alkalischen Bereich nach pH 4,60-4,90 (4).

2.5. Molekulargewichtsbestimmung mittels Gradientengel Elektrophorese

Prinzip:

Die Gradientengel-Elektrophorese bewirkt eine Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Zweck einer Gradientengel Elektrophorese ist es demnach, das Molekulargewicht eines isolierten Proteins zu bestimmen, oder die Bestandteile eines Proteingemisches aufzutrennen. Dieses geschieht, indem die Proben auf Gele aufgetragen werden, die ein immer enger werdendes Porennetz aufweisen. Die Proteine wandern während der Elektrophorese so weit in dem Gel, bis sie eine Porengröße erreichen, die sie nicht mehr durchdringen können. An dieser Stelle reichern sich die Proteine an und können so nachgewiesen werden.

Verwendete Gele:

Es wurden Gele der Firma Pharmacia benutzt, die eine Konzentration von 4% bis 30% Polyacrylamid aufweisen (PAA 4/30). Diese Gele ermöglichen eine Auftrennung im Bereich von einem Molekulargewicht von 50 000 bis 2 000 000.

Elektrophoresekammer:

Gel Electrophoresis Apparatus GE - 2/4, Pharmacia

An die Elektrophoresekammer läßt sich ein Kühlgerät anschließen.

Elektrophoresepuffer (pH 8,4):

0,09 M Tris

0,08 M Borsaure

0,93 g/l EDTA-Dinatriumsalz

Die Proben werden normalerweise in diesem Puffer gelöst. Da es sich bei einem Teil der Proben um Seren handelt, wurden diese 1 : 2 oder 1 : 4 mit dem Puffer verdünnt.

Dem Teil des Elektrophoresepuffers, mit dem die Proben versetzt werden sollen, wird 10 g/dl Glucose oder Saccharose und eine Spatelspitze Bromphenolblau hinzugegeben.

Dieses hat den Sinn, daß die Proben durch den Zucker schwerer werden und sich so leichter auf das Gel auftragen lassen. Der Farbstoff zeigt an, ob die Elektrophorese gleichmäßig über das Ganze Gel verläuft.

Mit Hilfe eines Probenapplikators lassen sich Proben von 10 - 20 µl auftragen.

Ablauf:

1. Vorlauf mit 70 V ca 15 - 20 min.

Der Vorlauf dient dazu, daß die aufgetragenen Proben in das Gel hineinwandern

2. Die eigentliche Elektrophorese zur Auftrennung der Proben wird für 15 - 16 Std. mit 150 V ausgeführt.

Das Kühlgerät wird auf 15 °C eingestellt.

Probennachweis:

In dieser Arbeit wurden zwei Methoden zum Nachweis der aufgetrennten Proteine verwendet:

- A.) Fixieren und Färben der Gele
- B.) Elektroblothing (siehe 2.6.2.)

A.) Fixieren und Färben der Gele

Fixierlösung:

10 g/dl Sulfosalicylsäure

Färbelösung:

0,02 g/dl Serva Blau in 7 g/dl Essigsäure

Entfärbelösung:

7 g/dl Essigsäure

Ablauf:

Nach der Elektrophorese wird das Gel für 30 min. in Fixierlösung getan. Die Färbung der Gele benötigt etwa 12 Std. Eine zur Auswertung der Gele hinreichende Entfärbung wird nach ca. 24 Std. erzielt.

Auswertung:

Die Bestimmung der Molekulargewichte erfolgt über einer Eichkurve, die mit Hilfe von Markerproteinen erstellt wurde. Aus dem Verhältnis von Laufstrecke des Proteins zu Gesamtgellänge ergibt sich ein Referenzwert. Dieser Wert ermöglicht es, mittels der Eichkurve das Molekulargewicht zu bestimmen.

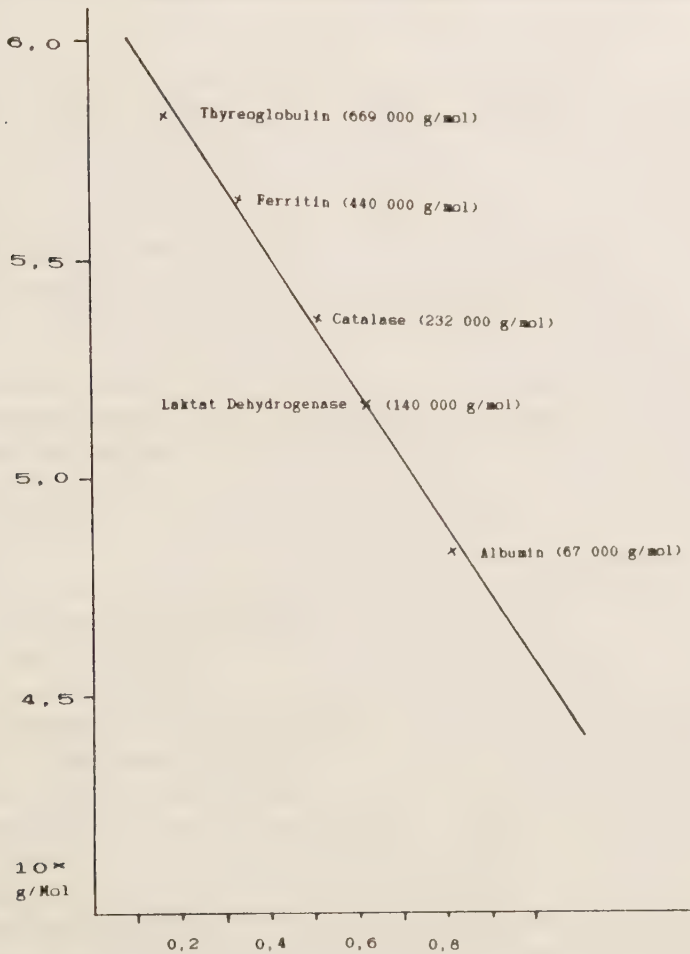


Abb. 1: Eichkurve zur Ermittlung des Molekulargewichtes auf Dichtegradientengelen. Der aus dem Verhältnis Gesamtgellänge zu Laufstrecke des untersuchten Proteins errechnete Wert wird in der Abszisse aufgesucht, mit Hilfe der Eichgeraden läßt sich das gesuchte Molekulargewicht auf der Ordinate ablesen.

2.6. Proteinblotting

2.6.1. Prinzip

Unter Proteinblotting versteht man den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus dem Gel auf eine immobilisierende Matrix, wie sie z.B. die Nitrozellulose darstellt. Ein anderes verwendetes Material ist das Zeta-Binde.

Die Proteine werden auf eine noch nicht genau bekannte Art und Weise gebunden, ohne dabei ihre Antigenität zu verlieren und sind so noch spezifischen Nachweismethoden mit Antikörpern zugänglich. Wahrscheinlich spielen verschiedene Faktoren, z.B. ionische Interaktionen oder hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten den Transfer von Proteinen aus den Gelen auf die Nitrozellulose zu vollziehen. Welche Methode Verwendung findet, hängt von den Voraussetzungen und von den Zielen des jeweiligen Experimentes ab. Wichtige Fragen dabei sind welches elektrophoretische System verwendet wird, wie groß die Menge des zu untersuchenden Proteins ist, wie effektiv der Transfer sein muß, und wie stark das Untersuchungsmaterial von anderen Substanzen verunreinigt ist.

Für die Zielsetzung dieser Arbeit ist es wegen der geringen Ausgangskonzentration des Serum TGs erforderlich, einen möglichst effektiven Transfer zu erreichen. Die mit Hilfe der IEF erzielte Mikroheterogenität des TG muß ohne Verlust der Auflösung auf eine Matrix transferiert werden, da eine Beeinträchtigung der Abgrenzbarkeit der Banden voneinander die Beurteilung des Jod- und Neuraminsäuregehaltes erschweren wurde.

In dieser Arbeit wurden folgende Methoden des Proteinblottings mit vorausgegangener IEF kombiniert, um zu testen, welche sich am besten zur Darstellung der Mikroheterogenität von TG eignet:

Diffusions Methode

Puffersog

Elektroblotting

Es wurden folgende Zellulosearten ausgetestet:

Nitrozellulose

Zeta Bind

2.6.2. Praktische Durchführung

Samtliche Gele, die geblottet werden sollten, wurden wie folgt vorbereitet:

Nach der IEF Entfernung der Elektrodenstreifen wie bei Punkt 2.4.2.2. beschrieben.

Danach wird das Gel für 1-2 min. in 300 ml 0,05 M Na-Phosphatpuffer gelegt. Dieses dient dazu, die für einen sauberen Proteintransfer unbedingt notwendige glatte Geloberfläche zu erhalten, da während der IEF an Stellen hoher Proteinkonzentrationen Unebenheiten auf dem Gel auftreten. Dieses ist besonders für den Transfer von Serum TG zu beachten, da Albumin sich in dem selben pH-Bereich wie das TG fokussiert.

2.6.2.1. Diffusions-Methode

Prinzip:

Bei dieser Methode wird die Nitrozellulose lediglich auf das Gel aufgedrückt, so daß es ohne Hilfe anderer Maßnahmen zu einer Diffusion der aufgetrennten Proteine auf die NZ kommt.

Ablauf:

Die NZ muß entsprechend der verwendeten Gelgröße zurechtgeschnitten werden. Bei dieser Arbeit, wie bei allen anderen Handhabungen der NZ auch, muß entweder mit Handschuhen oder mit Pinzetten gearbeitet werden, um Verunreinigungen der NZ, die bei der weiteren Bearbeitung zu Artefakten führen würden, zu verhindern.

Vor dem Proteinblotting muß die NZ einmal in aqua dest. getaucht werden, so daß sie vollständig benetzt ist. Das Gel wird aus dem Phosphatpuffer herausgenommen und auf eine Glasplatte gelegt.

Die NZ muß jetzt luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt werden. Sie muß gleich beim ersten Auflegen richtig liegen, da Korrekturen zu Artefakten führen würden.

Auf die NZ werden dann ein feuchtes (aqua dest.) und vier trockene Filterpapiere gegeben, die zuvor ebenfalls entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten wurden.

Zuletzt wird eine Glasplatte mit einem Gewicht von etwa 500g auf das kleine Paket gedrückt, so daß die NZ mit sanften Druck an das Gel gepresst wird.

Der Transfer dauert 2 h.

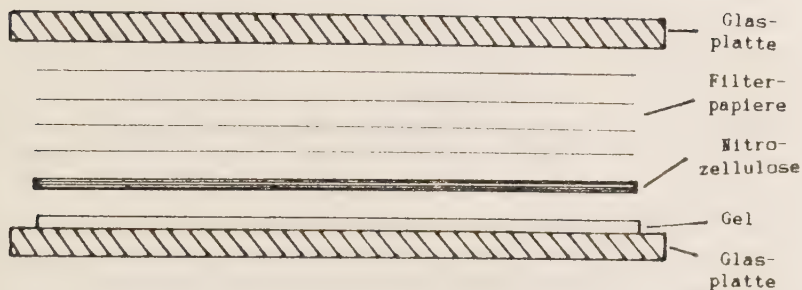


Abb.2: Diffusions-Methode, schematische Darstellung. Auf die obere Glasplatte kommt ein Gewicht von ca 500 g, welches einen gleichmäßigen Druck auf Gel und NZ ausüben soll.

2.6.2.2. Proteinblotting durch Puffersog

Prinzip:

Grundidee dieser Methode ist es, den Transfer von Proteinen aus dem Gel auf die Nitrozellulose dadurch zu erhöhen, indem man einen Puffersog durch das Gel und die NZ hindurch leitet. Auf diese Weise sollen die Proteine aus dem Gel heraus gespült werden und so in einer größeren Menge auf die NZ gelangen. Damit sollte erreicht werden, daß die Nachweisgrenze für TG verbessert bzw. weiter herabgesetzt wird.

Ablauf:

In diesem Fall, wie auch beim Elektrophoretoblotting, muß das Gel von seinem Träger heruntergenommen werden. Dieses ist notwendig, damit der Puffersog durch das Gel hindurchgeleitet werden kann. Da ein Ablösen des Gels vom Gelond-Film nicht möglich ist, wurden Glasplatten als Träger für die IEF benutzt.

Wie bei der Diffusions Methode werden benetzte NZ, feuchte und trockene Filterpapiere in entsprechender Größe und eine Glasplatte auf das Gel getan. Das ganze Paket wird jetzt umgedreht, so daß die Trägerglasplatte oben zu liegen kommt. Die Glasplatte muß nun vorsichtig abgenommen werden. Auf die freiliegende Gelfläche werden 5 Filterpapiere gelegt, die das Gel beidseits um etwa 6 cm überragen müssen. Die soeben vom Gel abgehobene Glasplatte wird jetzt wieder auf die Filterpapiere getan, so daß man das Blotting Paket zwischen den beiden Glasplatten hat.

Das Paket wird auf eine Tischplatte gegeben, die sich in einer kleinen, mit Transferpuffer, 0,05 M Na Phosphatpuffer, pH 7,4, gefüllten Wanne befindet. Die Enden der langen Filterpapiere müssen im Transferpuffer eintauchen, während der Rest des Blotting Paketes oberhalb des Pufferspiegels sein muß. Als letztes kommt ein etwa 3 cm starker Zellulosepacken zwischen der oberen Glasplatte und den Filterpapieren.

Mit dieser Anordnung soll erreicht werden, daß die oben liegenden Zellulosepacken den Transferpuffer über die langen Filterpapiere ansaugen, und so einen flow durch das Gel und die NZ erzeugen. Der Transfer dauert 3 h. Während dieser Zeit muß die Zellulose dreimal gewechselt werden, um einen gleichmäßigen Fluß aufrecht zu erhalten.

Es muß darauf geachtet werden, daß die Filterpapiere ober- und unterhalb des Geles keinen Kontakt haben, da sonst ein Teil des Puffers an Gel und NZ vorbeigehen würde.

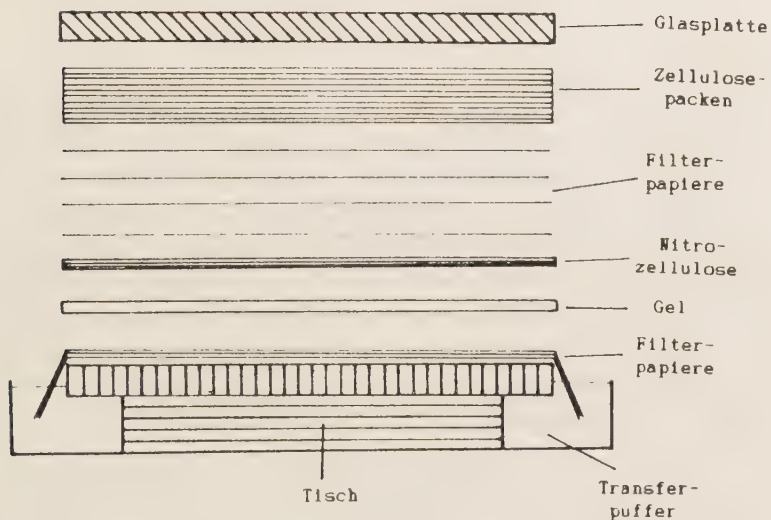


Abb. 3: Proteinblotting durch Puffersog. Das Blottingpaket steht in einem kleinen mit Transferpuffer gefüllten Becken über die in das Becken hineinragenden Filterpapiere wird der Transferpuffer angesaugt und zuerst durch das Gel und danach durch die NZ geleitet. Wie bei der Diffusions Methode wird das Paket mit einem Gewicht von etwa 500 g leicht zu sammengedrückt.

Proteintransfer nach Proteasespaltung

Prinzip:

Hierbei wird versucht, den Transfer dadurch effektiver zu gestalten, indem Makromoleküle mit Hilfe von Proteasen in kleinere Bruchstücke gespalten werden. Die kleinen Bruchstücke sollen dann leichter aus dem Gel herausgespült werden. Da Proteasen unspezifisch alle Peptidbindungen spalten, darf das TG nicht zu lange zu großen Enzymmengen ausgesetzt werden, da das Molekül seine antigene Struktur für den weiteren Versuchsablauf behalten muß.

Ablauf:

Zwischen dem Gel und den langen Filterpapieren, die den Transferpuffer ansaugen sollen, wird ein Filterpapier getan, welches zuvor in Pronase-Puffer getränkt wurde.

Es wurden 2,6 mg Pronase E in 60 ml PBS eingewogen.

2.6.2.3. Elektroblothing

Elektroblothing nach IEF auf 0,5 mm Agarose Gelen

Prinzip:

Das Elektroblothing unterscheidet sich von den zwei zuvor beschriebenen Methoden schon alleine durch den apparativen Aufwand. Es wird versucht, den Transfer dadurch effektiver zu gestalten, indem man die Proteine aus dem Gel mittels ei-

nes Stromflusses herauslösen und so in größeren Mengen auf die NZ bringen will.

Ablauf:

Auch hier ist es notwendig, daß die IEF auf einer Glasplatte ausgeführt wird, da das Gel zum Blotten von seinem Träger entfernt werden muß.

Wie schon zuvor beschrieben werden in entsprechender Größe zurechtgeschnittene NZ und Filterpapiere auf das Gel gegeben. Die Glasplatte wird vom Gel entfernt und auf die nun freiliegende Seite des Gels werden ebenfalls vier oder fünf Filterpapiere gelegt. Auf beide Seiten des Blottingpaketes kommt je ein etwa ein cm dicker Schwamm, ebenfalls von der Größe des verwendeten Gels. Das Blottingpaket wird in eine dafür vorgesehene Tasche getan, die das Paket leicht zusammendrücken und einen sicheren Halt bieten muß. Jedoch sollte der Druck nicht so stark sein, daß das Gel geschädigt wird. Außerdem darf die Tasche nicht den Stromfluß durch das Gel behindern. Die Tasche mit dem Blottingpaket muß so in die mit Transferpuffer gefüllte Entfärbekammer getan werden, daß die NZ zur Anode und das Gel zur Kathode zeigen, da das TG bei dem benutzten Transferpuffer negativ geladen ist.

Als Transferpuffer wurde verwendet:

25 mM Tris (3,02g/l)

192 mM Glycin (14,4g/l)

10 mM $MgCl_2$ (2,033g/l)

in aqua dest., pH 8,4, benötigt werden ca. 3l.

Am Spannungsgerät 12 V einstellen.

Der Transfer dauert 4 Std. Die Stromanzeige steht zu Beginn bei 1,6 A, während des Verlaufs steigt der Strom auf 2,2 A an.

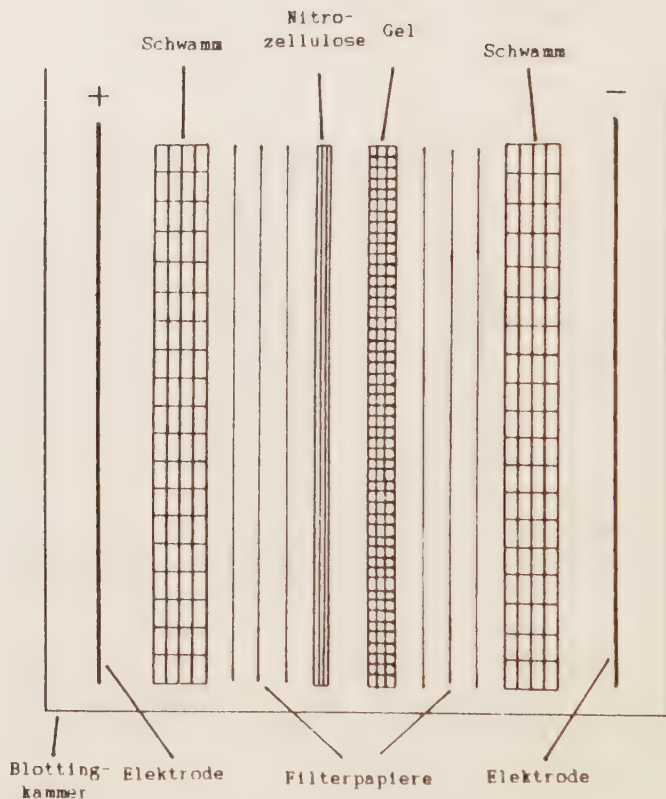


Abb. 4: Elektroblotting, schematische Darstellung. Gel und NZ werden von Filterpapieren und einem Schwamm auf jeder Seite geschützt, in eine dafür vorgesehene Tasche getan und leicht aneinander gedrückt. Die Blottingkammer wird soweit mit Transferpuffer gefüllt, daß die Tasche vollständig eingetaucht ist.

Elektroblotting von Proteinen aus 4/30 PAA**Dichtegradientengelen**

Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Methode des Elektroblottings von Proteinen aus Agarosegelen mittels einer Entfarbekammer, wurde für den Transfer von Proteinen aus den Polyacrylamid-Dichtegradientengelen eine speziell dafür konstruierte Blottingkammer benutzt. Diese Kammer, LKB 2005 Transphor Electroblotting Unit, hat in ihrem Deckel ein integriertes Spannungsgerät.

Die Verwendung einer Blottingkammer hat im Vergleich zu einer Entfarbekammer mehrere Vorteile:

- 1.) Die Blottingkammer ist so groß, daß zumindest zwei Gele gleichzeitig geblottet werden können.
- 2.) Mit dem integrierten Spannungsgerät können 70 V und mehr angelegt werden, was einen effektiveren Transfer zuläßt.
- 3.) Im Gegensatz zu der Entfarbekammer hat die Blottingkammer ein effizientes Kühlsystem.

Der Ablauf ist im wesentlichen mit dem oben beschriebenen identisch, ebenso der verwendete Transferpuffer.

Am Spannungsgerät werden 70 V eingestellt. Die Stromanzeige steht zu Beginn auf 500 mA. Als Transferdauer sind maximal 5 Std. vollkommen ausreichend. Im Verlauf von 5 Std. steigt die Stromanzeige auf 1000 mA an.

Das Kühlgerät wird auf 10 °C gestellt. Die Temperatur steigt nach 5 Std. auf 19 °C an.

2.6.3. Versuch zur Quantifizierung des Transfers der Diffusions- und Puffersogmethode

Der Versuch wurde mit J^{125} markiertem TG vorgenommen. Es handelt sich dabei um einen Tracer, der für einen TG-RIA verwendet wird. Es wurde ein Volumen von 5 μ l eingesetzt.

Ablauf:

1. IEF (siehe 2.4.)
2. Proteinblotting (siehe 2.6.2.1. und 2.6.2.2.)

Bestimmung des Transfers:

Nach Messung der aufgetragenen Ausgangsaktivität wurden folgende Meßwerte festgehalten:

1. Aktivität auf der NZ, die zum Blotten mittels Diffusions-Methode verwendet wurde,
2. Restaktivität auf den entsprechenden Gelteilen,
3. + 4. entsprechende Werte für das Blotten durch Puffersog.

Aus den gemessenen Werten wird die Quantität des Transfers der beiden Blottingmethoden ermittelt.

Auswertung und Aufbewahrung der Blottingergebnisse

Da die NZ mit der Zeit ausbleicht, wurden alle Blots photographiert.

Einige Photos von IEFs wurden mit einem Laser-Scanner densitometrisch ausgewertet.

2.7. Nachweis von TG mit spezifischen Antikörpern

2.7.1. Prinzip

Der Nachweis des an Nitrozellulose (NZ) oder Zeta-Bind (ZB) immobilisierten TG wird in drei Schritten ausgeführt:

1. Absättigung der freien Bindungsstellen
2. Inkubation der NZ oder ZB in Antikörperlösungen
3. Nachweis des TG Antikörper Enzymkonjugats

Bevor das TG mit Hilfe von Antikörpern (AK) identifiziert werden kann, müssen noch sämtliche freie Bindungsstellen auf der NZ blockiert werden. Dieses ist notwendig, da die NZ nicht nur die geblotteten Proteine, sondern natürlich auch Immunglobuline, mit denen sie inkubiert werden soll, sofort unspezifisch binden würde. Das hatte eine sehr starke Hintergrundanfarbung zur Folge, die die Ergebnisse beeinträchtigen würde. Als Blockierungssubstanzen können Albumin oder auch andere Serumproteine verwendet werden.

Die Identifizierung des TGs auf der Membran wird mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Mit ihnen wird eine Peroxydase (POD) an das TG gekoppelt. Im letzten Schritt wird die Membran mit einem Puffer inkubiert, dessen Substrat von der an TG angebrachten POD oxidiert wird. Dieses führt zu einem farblichen Niederschlag.

2.7.2...Ablauf

Absättigung der freien Bindungsstellen

Nach dem Proteinblotting wird die NZ für 2 Std. bei RT in 3% BSA in 0,05 M Na-Phosphatpuffer inkubiert. Es ist jedoch auch möglich, die NZ länger im Absättigungspuffer liegen zu lassen, etwa wenn die NZ erst am nächsten Tag weiterverarbeitet werden soll.

Die angegebene Blockierungslosung gilt für die fast ausschließlich verwendete NZ. Bei der Austestung der auf Nylonbasis beruhenden Zeta-bind, müssen folgende Bedingungen zur Blockierung der freien Bindungsstellen eingehalten werden: Inkubation für mindestens 12 Std. bei 45 °C in 10% BSA.

Inkubation der Membranen mit Antikörpern

Der Nachweis des TG aus den geblotteten Serumproteinen wird zunächst mit einem Anti-TG-AK vom Meerschweinchen (1.AK) geführt. Bei einer Konzentration von 1:100 in BSA muß die Menge der Antikörperlosung so bemessen sein, daß die gesamte NZ benetzt werden kann. Ausgehend von einer Breite der NZ entsprechend der Gelbreite, werden für eine NZ Länge von 12 cm 3ml und für 24cm 5ml benutzt.

Die Inkubationszeit beträgt 2 Std. bei RT.

Nach jeder Inkubation wird die NZ für 3 x 10 min mit PBS gespült.

Die Koppelung der POD an das durch den 1. AK identifizierte TG kann über zwei Wege erfolgen:

A.) Die NZ wird mit einem 2. AK inkubiert, der sich an den 1. AK anbindet. Es handelt sich dabei um einen gegen Meerschweinchen IgG gerichteten AK. An diesen AK ist POD kovalent gebunden.

Konzentration: 1:400

Der 2. AK wird mit TG-freiem-Serum im Verhältnis 3 : 1 vorinkubiert: 3 Teile 2. AK : 1 Teil TG-freies-Serum

Beispiel für 5 ml: 12,5 µl 2. AK auf 4983,5 µl BSA
+ 4 µl TG-0-Serum.

Inkubationsdauer: 2 Std. bei RT.

B.) Die NZ wird ebenfalls mit einem 2. AK, der sich gegen Immunglobuline vom Meerschweinchen richtet, inkubiert. In diesem Fall ist jedoch Biotin an den Antikörper gebunden. Konzentration: 1:500

Vorinkubation mit TG-freiem-Serum wie bei A.

Inkubationszeit: 2 Std. bei RT

Zur Ankoppelung von POD macht man sich die sehr hohe Affinität von Avidin an Biotin zunutze. Die NZ wird nach einem entsprechenden Spülschritt mit Avidin-D inkubiert, an welches POD gebunden ist.

Konzentration: 1:500

Inkubationszeit: 2 Std.

Bei der Verwendung von Avidin/Biotin wird der 1. AK in einer Konzentration von 1:200 eingesetzt.

Nachweis des Antikörper-Enzymkonjugats

Die jetzt spezifisch über Antikörper an das TG gebundene POD muß nun noch über eine Farbereaktion sichtbar gemacht werden.

Dazu wird die NZ in einem Substratpuffer inkubiert, der einen Farbstoff enthält. Mittels der gebundenen POD und Wasserstoffperoxyd läuft mit dem Farbstoff eine Reaktion ab, die zu einem farbigen Niederschlag führt.

Ablauf:

Es wurden zwei verschiedene Farbstoffe verwendet:

A.) 3-Amino-9-Ethylcarboxol

B.) 4-Chlor-1-Naphtol

A.) Die NZ wird zunächst für 10 min. in 0,05 M Na-Acetat - puffer vorinkubiert.

Der Substratpuffer wird hergestellt aus 20 mg Ethylcarboxol, die in 5ml Dimethylformamid gelöst werden. Nach Auflösen des Carboxols werden 95 ml Na-Acetatpuffer hinzugegeben. Kurz vor Gebrauch des Farbstoffes werden 50 µl 30 %iges H_2O_2 hineinpipettiert.

Die NZ wird 15 min. in einer lichtundurchlässigen Metallschale mit dem Substratpuffer inkubiert.

Zur Beendigung der Farbereaktion wird die NZ mit aqua dest. gespült. Die Reaktion sollte auf alle Fälle gestoppt werden, sobald sich der Hintergrund der NZ stärker anfärbt.

B.) Der Substratpuffer wird aus 60 mg Chlor-Naphtol hergestellt, die in 20 ml Methanol gelöst werden. Diese Lösung mit einer Konzentration von 3mg/ml ist in einem lichtundurchlässigen Gefäß einige Wochen haltbar.

20 ml dieser Stammlösung werden zu 100 ml Na-Acetatpuffer hinzugegeben. Weitere Behandlung wie bei A., eine Vorinkubation in Na-Acetatpuffer findet nicht statt.

2.7.3. Austestung der optimalen Antikörper-Konzentrationen

Die Verwendung ganz bestimmter AK-Konzentrationen ist deshalb notwendig, da zu niedrig gewählte Konzentrationen zu schlecht oder gar nicht angefärbten Banden führen würde. Es muß immer mit einem Antikörperüberschuß gearbeitet werden. Es dürfen aber auch nicht zu große AK-Mengen verwendet werden, da dieses zu einer starken Hintergrundanfärbung führen würde.

Bei der Austestung wurde das Dot-Blottingsystem verwendet. Hierbei werden bekannte TG-Mengen direkt auf die NZ pipettiert. Diese werden dann mit verschiedenen AK-Konzentrationen nachgewiesen.

Ablauf:

Der Vorversuch wurde für beide verwendete 2. AK durchgeführt:

A.) 2. AK + POD

B.) 2. AK + Biotin

A.) Auf neun NZ-Streifen wurden je 5 μ l folgender TG-Konzentrationen aufgetragen: 50 μ g/ml; 5 μ g/ml, 0,5 μ g/ml.

1. AK:

1:100	1	4	7
-------	---	---	---

1:200	2	5	8
-------	---	---	---

1:400	3	6	9
-------	---	---	---

2. AK:	1:100	1:200	1:400
--------	-------	-------	-------

Es wurden folgende AK-Konzentrationen miteinander kombiniert:

1.AK: 1:100, 1:200, 1:400.

2.AK: 1:100, 1:200, 1:400.

Inkubationszeiten und Waschvorgänge wie bei 2.6.2. beschrieben, Färbereaktion mit Ethylcarboxol.

B.) Hier wurden 5 μ l folgender TG-Mengen auf die neun NZ-Streifen pipetiert: 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1 μ g/ml

Alle Streifen wurden mit einer Konzentration von 1:200 des 1.AK inkubiert.

2.AK: 1:100, 1:500, 1:1000

Avidin: 1:100, 1:500, 1:1000

2: AK:

1:100	1	4	7
-------	---	---	---

1:500	2	5	8
-------	---	---	---

1:1000	3	6	9
--------	---	---	---

Avidin:	1:100	1:500	1:1000
---------	-------	-------	--------

Inkubationszeiten und Waschschritte wie beschrieben, Färbereaktion mit Chlor-Naphtol.

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich der verschiedenen Transferbedingungen

Vergleich der Blottingmethoden

Mit allen drei verwendeten Blottingmethoden läßt sich die Mikroheterogenität von reinem, aus Schilddrüsen gewonnenem TG in einer Konzentration von 5 µg/ml qualitativ ausreichend darstellen. Eine Abgrenzbarkeit der Banden voneinander ist möglich.

Was die Scharfe und Prägnanz der Banden betrifft, so zeigt sich jedoch die Diffusions-Methode den beiden anderen Blottingsystemen überlegen.

Dieser qualitative Unterschied wird beim Blotting von Patientenseren noch deutlicher. Bei der Verwendung der Diffusions-Methode läßt sich das TG aus dem Serum von Patienten mit benignen Schilddrüsenerkrankungen und Spiegeln um 1µg/ml in gut differenzierbare Banden darstellen. Dagegen lassen die Puffersog Methode und das Elektroblotting bei diesen Seren nur eine grobe Differenzierung des angefärbten Be reiches zu.

Vergleich der Quantität des Transfers von Puffersog und Diffusionsmethode

Die Messungen der Aktivität des mit diesen beiden Methoden auf die NZ transferierten mit J¹²⁵ markierten TGs ergab folgende Werte:

Ausgangsaktivität: 48564 cpm

	Diffusion	Puffersog
Gel	1286 cpm = 2,6%	552 cpm = 1,1%
NZ	45526 cpm = 93,7%	37983 cpm = 78,21%

Bei den Messungen handelt es sich:

Ausgangsaktivität: Durchschnittswert von 4 Messungen

Puffersog: Durchschnittswerte von 4 Messungen

Diffusion: Durchschnittswerte von 3 Messungen

Erhöhung der Sensitivität des Nachweises von reinem TG

Bei den ersten Blots lag die Nachweisgrenze für in Phosphatpuffer eingewogenes TG etwa bei 50 µg/ml. Proben mit 5 µg/ml waren nur sehr schwach zu erkennen, eine Differenzierung der einzelnen Banden war daher nicht möglich.

Eine deutliche Verbesserung der Nachweisgrenze für reines TG wurde erzielt, wenn 0,1 g% α -Globulin hinzugegeben wurden, um die unspezifische Absorption des TGs einzuschränken. Auf diese Weise ließ sich die Nachweisgrenze deutlich senken. Gut differenzierbare Banden erhielt man dann schon mit 5 µg/ml TG, 0,5 µg/ml TG ließen sich gerade noch nachweisen, eine genauere Bandeninterpretation ließ diese Konzentration jedoch nicht zu.

50 µg/ml TG ergaben bei der Verwendung von α -Globulin eine zu starke Anfarbung, eine Interpretation der Banden war ebenfalls nicht möglich.

Das α -Globulin zeigte weder mit dem ersten noch mit dem zweiten AK eine unspezifische Reaktion.

Einfluß von Pronase auf den Transfer

Es wurde versucht, die Quantität des Transfers mittels Pronase zu erhöhen. Beim Blotting durch Puffersog nach IEF auf 0,5 mm dicken Agarosegelen zeigte sich jedoch keine Senkung der Nachweisgrenze für TG. Die Ergebnisse mit und ohne Pronase waren identisch.

Auf der anderen Seite beeinflusste die Pronase nicht den weiteren Nachweis von TG mit spezifischen Antikörpern.

Vergleich Nitrozellulose - Zeta-Bind

In dieser Arbeit wurde fast ausnahmslos NZ als immobilisierende Matrix zur Fixierung der Proteine für die weitere Verarbeitung benutzt. Beim Vergleich NZ - Zeta-Binde farbte sich der Hintergrund beim Zeta-Bind wesentlich stärker an als bei der NZ, was die Differenzierung und die Interpretation der Banden wesentlich erschwerte.

3.2. Vergleich der Nachweismethoden

Vergleich der verschiedenen Anti-Meerschweinchen IgGs

Die Austestung der verwendeten AK mit dem Dot Blotting ergab folgendes Ergebnis:

A.) Die in den Methoden beschriebenen AK Konzentrationen für den 1. AK und den mit POD gekoppelten 2. AK erwiesen sich anderen ausprobierten Konzentrationen als überlegen. Höhere AK-Konzentrationen bewirkten eine zu starke Hintergrundanfärbung und beeinträchtigten so das Ergebnis. Niedrigere Konzentrationen wirkten sich negativ auf die Nachweisgrenze aus.

B.) Gleiches gilt für das Avidin/Biotin System. Die in den Methoden angegebenen Konzentrationen stellen einen Kompromiß zwischen notwendiger TG Anfärbung und noch tolerabler Hintergrundanfärbung dar.

Beim Vergleich im Dot-Blottingverfahren zeigt sich das Avidin/Biotin System dem mit POD direkt gekoppelten 2. AK in der Sensitivität deutlich überlegen.

Mit dem Avidin/Biotin System läßt sich TG bei einer Konzentration von 100 ng/ml und einem aufgetragenen Volumen von 5 µl auf der NZ noch mit einer kräftigen Anfärbung nachweisen.

Bei der Verwendung des mit POD gekoppelten 2. AK läßt sich TG ebenfalls bei einem Auftragungsvolumen von 5 µl bei einer Konzentration von 500 ng/ml nur noch sehr schwach nachweisen

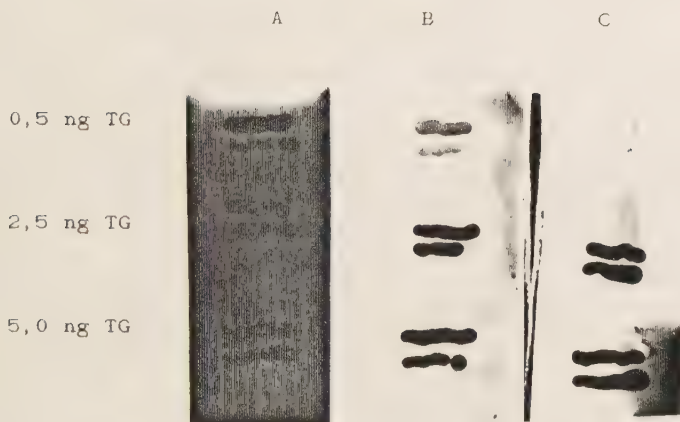


Abb. 5:

Dot-Immunobinding von TG zur Austestung der optimalen AK-Konzentrationen. 1. AK 1:200; 2. mit Biotin gekoppelter AK 1:500; Avidin + POD: A 1:100; B 1:500; C 1:1000

Es wurden 3 verschiedene TG-Mengen direkt auf die NZ pipettiert und mit den angegebenen AK-Konzentrationen nachgewiesen.

Beim Proteinblotting mit der Diffusionsmethode konnten bei der Verwendung des Avidin/Biotin-Systems Patientenseren bis zu einer Konzentration von 200 ng/ml herunter untersucht werden.

Kreuzreaktionen der Antikörper

Beide verwendeten 2. AK zeigten Kreuzreaktionen mit Serumproteinen. Dieses führte zu schwach angefärbten Banden, die vom TG aus gesehen weiter im alkalischen Bereich der IEF lagen. Beim Blotten von TG-freiem-Serum zeigte es sich, daß im Bereich von pH 4,20-4,60 keine unspezifischen Reaktionen stattfanden. Im Bereich 4,60 - 4,90 kam es zu geringen Kreuzreaktionen.

Durch Vorinkubation des 2. AK mit TG-freiem-Serum ließen sich die unspezifischen Reaktionen zum Teil beseitigen.

Vergleich der Färbesubstanzen

Die Wahl des Substrates für die Farbereaktion hatte bei den beiden verwendeten Substanzen keinen signifikanten Einfluß auf die Qualität der Ergebnisse.

Das Chlor-Naphthol zeigte allenfalls gering weniger Hintergrundanfärbung als das Ethylcarboxol.

3.3. Mikroheterogenität von reinem TG

IEF mit Agarosegelen

Eine IEF auf 0,5 mm dicken Agarosegelen mit einem pH-Gradienten von 4,0-6,5 von isoliertem intrathyreoidalem TG ergab nach Anfärbung mit Serva Violett reproduzierbar eine Mikroheterogenität von 6 Banden. Die einzelnen Banden hatten ihren isoelektrischen Punkt (PI) bei:

pH 4,20; pH 4,35; pH 4,40; pH 4,50; pH 4,55 und pH 4,60. Die Banden unterschieden sich in der Stärke der Darstellung und in der Abgrenzbarkeit zur Umgebung. Am stärksten kam die Bande mit pH 4,50 zur Darstellung. Die Banden bei pH 4,60, pH 4,55 und pH 4,40 stellten sich noch relativ intensiv dar, jedoch schon weniger ausgeprägt als die zuvor genannte. Die Bande mit dem PI bei pH 4,40 grenzte sich zur Umgebung nur sehr unscharf ab. Schon deutlich schwächer war die Bande bei pH 4,35. Die Bande mit dem niedrigsten PI, pH 4,20 ließ sich nicht regelmäßig nachweisen. Bei einer aufgetragenen TG-Menge von 25 µg lag diese Bande etwas unter der Nachweisgrenze.

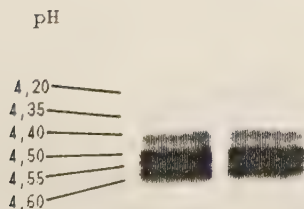


Abb. 6:

Mikroheterogenität von isoliertem intrathyreoidalem TG nach IEF auf 0,5 mm dicken Agarosegelen und Färbung mit Serva Violett. Aufgetragene TG-Menge: 25 µg

IEF mit anschließendem Proteinblotting

Nach IEF und anschließendem Proteinblotting ließ sich das isolierte, intrathyreoidale TG auf der NZ mit spezifischen Antikörpern nachweisen. Dabei zeigte das TG die gleiche Mikroheterogenität von 6 Banden. Bei der Verwendung von mit POD gekoppelten Antikörpern war die Intensität der mittels Inkubation in einen Substratpuffer erreichten Präzipitation der einzelnen Banden im Verhältnis zueinander identisch mit derjenigen Intensität der einzelnen Banden, die durch direkte Anfärbung der Gele erzielt wurde.

Beim Proteinblotting war die Bestimmung der PIs mittels Marker nicht möglich, die spezifischen Antikörper hätten die Marker nicht nachgewiesen. Deshalb diente das intrathyreoidale TG als Referenz für das Serum-TG. Um einen größeren pH-Bereich abdecken zu können, wurden in einer Probe normales TG und vollständig desialisiertes TG aufgetragen.

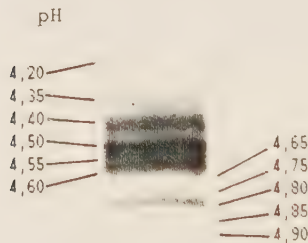


Abb. 7:

Normales und desialisiertes TG, welches mittels Proteinblotting nach IEF auf eine immobilisierende Matrix transferiert und dort mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen wurde. Aufgetragene TG-Menge: 25 ng TG + 25 ng desialisiertes TG

3.4. Molekulargewichtsbestimmung von reinem TG

PAA Dichtegradientengel Elektrophorese

Es wurde das TG aus vier Präparationen, die mittels Säulenchromatographie gereinigt wurden (2.3.1) untersucht. Bei dem Schilddrusengewebe, aus dem das TG isoliert wurde, handelte es sich um OP Material von zwei Patienten mit Kaltem Knoten, einem mit Autonomem Adenom und einem mit Strumamaligna.

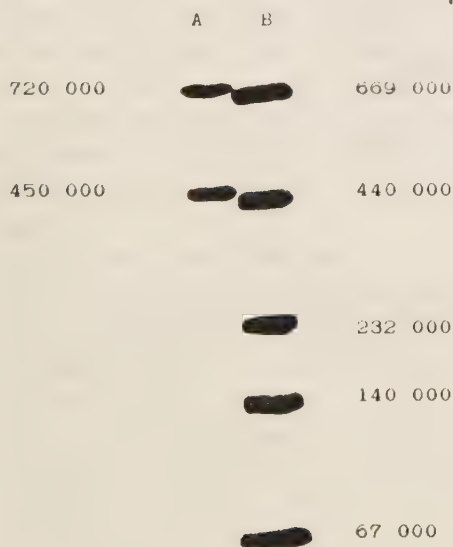


Abb. 8: Schematische Zeichnung einer Dichtegradientengel-Elektrophorese. A: TG aus Kaltem Knoten über Säulenchromatographie isoliert B: Markerproteine; Werte = g/Mol

Die Untersuchung des aus den vier Präparationen gewonnenen Probenmaterials ergab jeweils zwei Banden. Die Molekulargewichtsbestimmung ergab folgende Werte:

Das isolierte TG aus einem Kalten Knoten hat eine höhermolekulare Bande mit einem Gewicht von ca. 740 000g/mol und eine mit einem niedrigeren Molekulargewicht von etwa 460 000.

Die anderen drei Präparationen ergaben zwei Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 720 000 und 450 000 (Abb. 8).

Es wurden zwei Proben, Eluat aus Schilddrusengewebeschnitten zweier Patienten mit Kaltem Knoten und mit Struma Maligna, die nicht weiter bearbeitet wurden, mittels Dichtegradientengel Elektrophorese untersucht. Dabei zeigte das TG aus der Struma maligna 7, das aus dem Kalten Knoten 8 Banden. Fünf Banden hatten bei beiden Proben das gleiche Molekulargewicht, zwei Banden unterschieden sich in der Laufstrecke. Des weiteren zeigte sich eine Hintergrundanfärbung über die gesamte Gellänge (Abb. 9).

Proben aus dem gleichen Gewebe, die über Säulenchromatographie gereinigt und isoliert wurden, zeigten nur zwei Banden bei der Dichtegradienten - Elektrophorese (siehe Abb. 8).

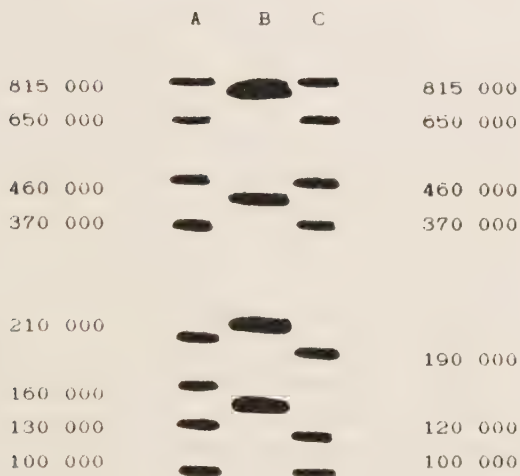


Abb. 9:

Dichtegradientengelelektrophorese mit 4/30 PAA Gelen
 Eluat aus Schilddrusengewebeschnitten.
 Schematische Darstellung, die schleierige Hintergrundan-
 färbung ist nicht eingezeichnet.

Aufgetragenes Volumen: 15 µl

Die angegebenen Zahlen haben die Einheit g/Mol

A: Kalter Knoten

C: Struma Maligna

B: Markerproteine, Molekulargewicht siehe Abb. 8

PAA Dichtegradientengel-Elektrophorese mit anschließendem Proteinblotting

Es wurden folgende Proben von intrathyreoidalem IG nach Dichtegradientengel Elektrophorese mittels Elektroblothing auf NZ transferiert und dort mit Antikörpern nachgewiesen:

1.) Zwei Proben aus Schilddrüsengewebe von Patienten mit Kalten Knoten, welche durch Säulenchromatographie gereinigt wurden, ergaben 2 Banden mit identischer Laufstrecke wie bei Abb. 8.

2.) Zwei Proben aus Schilddrüsengewebe von einem Patienten mit Kaltem Knoten und einem mit Struma maligna, die mittels Ausschüttelung aus Gewebeschnitten gewonnen wurden, zeigten eine durchgehende Anfärbung über den gesamten Gradientenbereich. Einzelne Banden, wie bei Abb. 9 beschrieben, konnten nicht abgegrenzt werden.

Das Gel, mit dem diese vier Proben elektrophoretisch nach ihrer Dichte aufgetrennt wurden, lief gleichzeitig mit dem Gel, dessen Ergebnisse in den Abb. 8 und 9 dargestellt sind. Somit sind die von den auf NZ immobilisierten Proteinen gemessenen Laufstrecken vergleichbar mit denen, die für die Proben auf dem direkt gefärbten Gel festgestellt wurden.

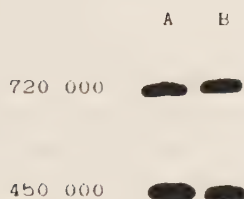


Abb. 10:

Elektroblotting nach Dichtegradientengel-Elektrophorese auf 4/30 PAA-Gelen. A und B: über Säulenchromatographie isoliertes TG aus Schilddrüsengewebe von Patienten mit Kalten Knoten. Wie in Abb. 8 stellt sich das TG in zwei Banden dar. Probenmaterial, welches nur durch Ausschüttelung aus Schilddrüsenschnitten gewonnen wurde, zeigte eine Anfärbung über die gesamte Geillänge, einzelne Banden waren nicht abgrenzbar. Da die Markerproteine auf der NZ nicht nachgewiesen werden können (es gibt keine gute Färbemethode für NZ), erfolgte die Ermittlung der Molekulargewichte über eine Eichkurve, die mit Hilfe eines parallel gelaufenen Geles erstellt wurde.

3.5. Mikroheterogenität von TG aus dem Serum von Patienten mit benignen Schilddrüsenerkrankungen

Sämtliche untersuchten Seren von Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen zeigten im pH-Bereich von 4,20 bis 4,90 die für intrathyrenoidales TG bekannte Mikroheterogenität.

In diesem pH Bereich sind keine neuen, bisher nicht bekannten Banden entdeckt worden.

Die Patientenserum zeigten jedoch deutliche Unterschiede in der Ausprägung der einzelnen Banden.

Mikroheterogenität von TG bei Patienten mit Morbus Basedow

Es wurde das TG aus dem Serum von 6 Patienten mit M. B. mit IEF und anschließend Proteinblotting durch Diffusion untersucht. Bei vier Patienten wurde das Ergebnis noch densitometrisch ausgewertet.

Mit fünf Proben wurden gut auswertbare Ergebnisse erzielt, eine Probe ergab eine nicht zufriedenstellende Abgrenzbarkeit der Banden. Es ließ sich hier (F) jedoch festhalten, daß sich die Bande mit PI bei pH 4,60 bei beiden untersuchten Serumproben am intensivsten darstellte. Es handelte sich bei beiden Serumproben vor und 6 Wochen nach Beginn einer thyreostatischen Therapie, um niedrig jodiertes TG.

Von den fünf anderen untersuchten Proben hatten vier gut differenzierbare Banden mit denen für TG spezifischen Isoelektrischen Punkten zwischen pH 4,20 und pH 4,60 erbracht.

Bei der Auswertung zeigten drei der vier Seren die stärkste Bande bei pH 4,60 (LE, A, B). Die Bande pH 4,35 war bei diesen Seren überhaupt nicht, die bei pH 4,40 allenfalls nur sehr schwach darstellbar. Die Bande bei pH 4,50 war dann

schön wesentlich deutlicher, gefolgt von der stärksten Bande bei pH 4,60. Unterhalb von pH 4,60 war keine Bande mehr sicher abgrenzbar.

Das TG aus dem Serum eines Patienten (HE) zeigte die ausgeprägteste Bande bei pH 4,40, gefolgt von einer auch noch sehr kräftigen Bande bei 4,50. Die Bande bei pH 4,60 stellte sich schon wesentlich schwächer dar. Im Gegensatz zu den TGs der drei zuvor beschriebenen Seren zeigte dieses auch noch eine relativ kräftige Bande bei pH 4,35.

Die Ergebnisse lassen sich sowohl visuell erheben, als auch densitometrisch reproduzieren (siehe Abb. 12 und 14).

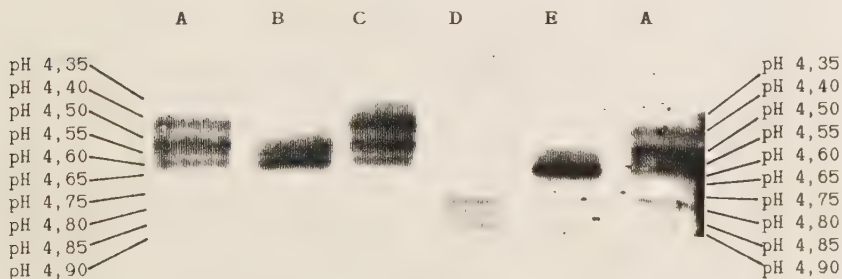


Abb. 11:

Vier Seren von Patienten mit M. B. nach IEF auf 0,5 mm Agarosegelen mit anschließendem Proteinblotting durch Diffusion. Eine visuelle Abgrenzbarkeit der Banden voneinander und die Bestimmung der am intensivsten angefärbten Banden ist möglich.

A: TG und dTG je 25 ng als Referenz.

B: A, C: H, D: SCH, E: LE

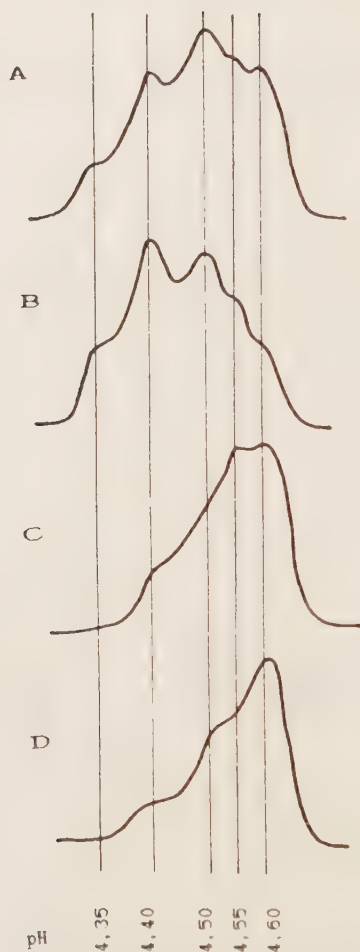


Abb. 12:

Densitometrische Auswertung mit Laser Scanner des in Abb. 11 gezeigten Photos eines Blots

Auch nach Photographie ist die Auflösung der einzelnen Banden noch ausreichend, so daß sie vom Scanner nachvollzogen werden kann A: Intrathyreoidales TG, B-D: Serum-TG von Patienten mit M.B. B: H, C: A, D: LE

Tabelle 1, Schilddrüsenparameter der Patienten mit M. B.:

Pat.		$T_{4\text{mg}}\%$	$T_{4\text{mg}}\%$	$T_{3\text{mg}}\%$	$\text{FSH}_{\mu\text{U/ml}}$	TRH_{U}	$T_{4\text{mg}}/\text{ml}$	FSI	Therap.
A	21 J/w	71	1,0	2,3	-	-	1234	-	++
B	55 J/w	105	3,4	2,6	0,5<	0,8	440	81(++)	+
E	78 J/w	334	17,9	2,0	0,5	-	276	-	-
	35d später	230	11,6	2,1	n.m.	-	759	-	+
H	43 J/w	-	6,9	2,0	0,5<	1,0	541	23+++	+
LE	30 J/w	152	8,3	1,7	0,7	9,7	570	-	-
SCH	- /w	128	-	-	-	-	331	-	++

Therap: Thyreostatische Therapie

++: Bei diesen Patienten ergeben vorhergehende Kontrollen erhöhte Werte für T_3 und T_4 (A) oder nur für T_4 (SCH).

Das TG aus dem Serum des 6. Patienten (SCH) bestand fast ausschließlich aus desialisiertem TG. Die Mikroheterogenität zeigte drei gut voneinander abgrenzbare Banden mit PI bei pH 4,80, pH 4,85 und bei pH 4,90 (Abb.11). Damit unterschied sich dieses Ergebnis von den anderen Patienten mit M. B., die ausschließlich eine für normal sialisiertes TG typische Mikroheterogenität aufwiesen.

Daneben waren noch drei Banden mit pH 4,40, pH 4,50 und pH 4,60 sehr schwach dargestellt, von denen die mit PI bei pH 4,60 noch die am stärksten angefarbte war.

Mikroheterogenität von IG aus dem Serum von Patienten mit anderen benignen Schilddrüsenerkrankungen

Es wurden noch drei Seren von Patienten mit folgenden benignen Schilddrüsenerkrankungen untersucht:

Autoimmunthyreoiditis (Hashimoto), euthyreote Stoffwechsellage, keine Therapie

Struma mit zwei Kalten Knoten, euthyreote Stoffwechsellage, keine Therapie

Autonomes Adenom

Autonomes Adenom:

Die Mikroheterogenität dieses IGs hatte seine deutlichste Ausprägung bei pH 4,60, eine weitere etwas schwachere Bande war bei pH 4,50. Weiter im sauren Bereich ließen sich keine Banden mehr nachweisen. Daneben ließ sich jedoch noch eine Bande im desialisierten Bereich bei pH 4,75 feststellen.

Kalter Knoten:

Die Mikroheterogenität des IGs aus dem Serum eines Patienten mit zwei Kalten Knoten zeigte ebenfalls seine kräftigste Bande bei pH 4,60. Daneben waren jedoch auch noch bei pH 4,50 und 4,40 recht starke Banden zu sehen, während die bei pH 4,35 nur noch schwach ausgeprägt war.

Auch dieses TG wies in seiner Mikroheterogenität Banden im desialisierten Bereich auf, bei pH 4,75 und pH 4,80.

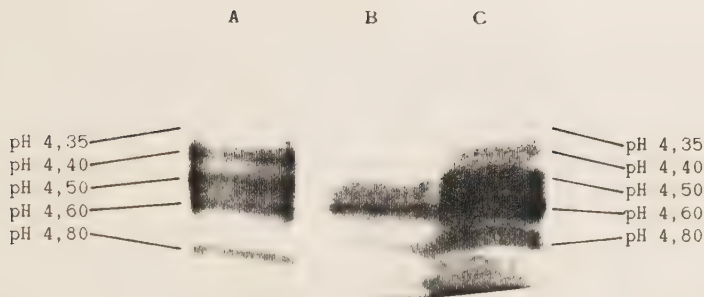


Abb. 13: Proteinblotting nach IEF von TG aus dem Serum von zwei Patienten mit benignen Schilddrüsenerkrankungen.

A : Je 25 ng TG und dTG als Referenz.

B : TG aus dem Serum eines Patienten mit Autonomem Adenom

Die Bande bei pH 4,60 färbte sich am intensivsten an, deutlich schwächer bei pH 4,50. Geringe desialisierte Anteile bei pH 4,75 oder pH 4,80.

C : TG aus dem Serum eines Patienten mit einer Struma und zwei Kalten Knoten. Die Mikroheterogenität ließ sich über den gesamten, für TG typischen, Bereich von pH 4,35 bis 4,60 beurteilen, lediglich die Bande pH 4,20 war nicht abgebildet. Daneben deutlich desialisierte Anteile mit pH 4,80.

Autoimmunthyreoiditis (Hashimoto)

Das Bandenmuster des TGs aus dem Serum eines Patienten mit Autoimmunthyreoiditis ließ sich von pH 4,20 bis pH 4,60 verfolgen und beurteilen. Daneben waren auch Banden im desialisierten Bereich nachweisbar. Am intensivsten waren die Banden mit PI bei pH 4,40 und pH 4,50 angefärbt, gefolgt von der Bande pH 4,60. Die Bande pH 4,55 ließ sich nicht sicher

abgrenzen. Die Banden mit pH 4,35 und pH 4,20 waren schwach angefärbt. Im desialisierten Bereich zeigten sich zwei sehr scharf begrenzte Banden mit pH 4,80 und pH 4,90. Zwischen diesen beiden Banden lag eine weitere, die sich nur etwas unscharf von der Umgebung abgrenzte.

Beurteilung des Jodgehaltes von TG aus dem Serum von Pat. mit benignen Schilddrüsenerkrankungen.

Die untersuchten extrathyreoidalen TGs wiesen sehr unterschiedliche Jodierungsgrade auf. In der Gruppe der Patienten mit M. B. wurde ein TG mit der ausgeprägtesten Bande bei pH 4,40 gefunden, was einem hohen Jodierungsgrad entspricht. Die anderen TGs hatten mit pH 4,60 ihre stärkste Bande, sind also niedrig jodiert. Somit wies die Patientengruppe mit M. B. keinen einheitlichen, für sie typischen Jodgehalt auf.

Von den anderen Patientengruppen lagen nur Einzeluntersuchungen vor. Dabei zeigten die Pat. mit Autonomem Adenom und mit Kaltem Knoten niedrig jodiertes TG, der Pat. mit Autoimmunthyreoiditis dagegen hoch jodiertes TG.

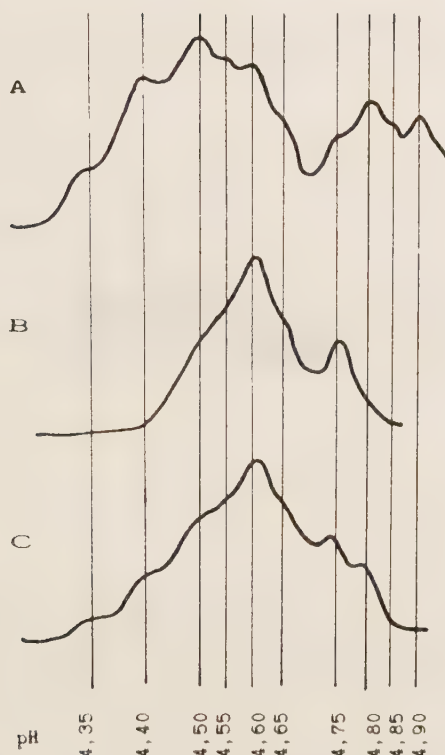


Abb. 14:

Densitometrische Auswertung mit Laserscanner eines Photos des in Abb. 13 gezeigten Blots. A : TG und dTG als Referenz.

B : TG aus dem Serum eines Patienten mit Autonomem Adenom. Deutlich stärkste Bande bei pH 4,60, Bande bei pH 4,40 nicht nachweisbar. Daneben desialisierte Anteile. C : TG aus dem Serum eines Patienten mit Kaltem Knoten. Ebenfalls intensivste Bande bei pH 4,60, geringer Nachweis der Bande bei pH 4,40. Desialisierte Anteile bei pH 4,75 und pH 4,80.

3.6. Mikroheterogenität von IG aus dem Serum von Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom

Es wurde das IG aus dem Serum von fünf Patienten mit follikulärem Schilddrüsen-Ca untersucht. Bei einem Patienten konnte der Verlauf während einer Radioiodtherapie verfolgt werden. Bei den anderen vier Patienten lagen jeweils nur eine Serumprobe vor.

Bei einem Patienten wurde das Serum IG nach Abspalten der endständigen Neuraminsäure untersucht

Mikroheterogenität des IGs aus den vier Einzeluntersuchungen

Das Serum-IG dieser vier Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom zeigte in seiner Mikroheterogenität nur Banden, die aus den Untersuchungen mit reinem intrathyreoidalem IG bekannt sind. Es wurde kein krankheitsspezifisches Tumor-IG gefunden.

Zwei IGs hatten eine Mikroheterogenität, deren Schwereweichte bei pH 4,60 und pH 4,80 lagen. Daneben waren noch schwächere Banden sowohl mit höherem wie auch mit niedrigerem PI abgrenzbar.

Die zwei anderen IGs zeigten ein Bandenmuster mit der größten Intensität bei pH 4,40 bzw bei pH 4,40 und 4,50. Bei diesen beiden IGs fand man keine Hinweise auf desialisierte Anteile.

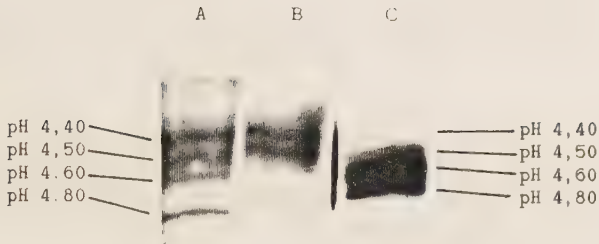


Abb. 15:

TG aus dem Serum von zwei Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom (B,C) nach IEF und Proteinblotting durch Diffusion. A : TG und dTG als Referenz je 25 ng
C zeigte die intensivste Bande bei pH 4,60, daneben noch eine sehr kräftige bei pH 4,80. Bei pH 4,50 ist eine etwas schwächere, jedoch sehr scharf begrenzte Bande, bei pH 4,40 war noch eine wenig angefärbte Bande abgrenzbar. Dieses TG war niedrig jodiert mit desialisierten Anteilen.
Die Mikroheterogenität von B wies auf hoch jodiertes TG hin, es fanden sich keine Anzeichen für desialisiertes TG.

Jodierungsgrad:

Die Gruppe der Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom zeigte, wie die Gruppe mit M. B., keinen einheitlichen Jodierungsgrad.

Zwei Patienten hatten ein niedrig jodiertes TG im Serum, daneben auch desialisierte TG-Anteile, die zwei anderen zeigten ein hoher jodiertes TG, dabei kein desialisiertes TG (Abb. 15).

Verlaufsbeobachtung der Mikroheterogenität von Serum TG während einer Radiojodtherapie

Von einem Patienten lagen mehrere Serumproben vor, die während des Verlaufes einer Radiojodbehandlung von Metastasen eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms entnommen wurden.

Drei Wochen nach der 1. Radiojodtherapie (RIT) hatte der Patient einen TG-Spiegel von 66 500 ng/ml. Die Mikroheterogenität (1. Untersuchung) zeigte die prägnantesten Banden bei pH 4,40 und 4,50, die Banden bei pH 4,35 und 4,60 waren schon wesentlich schwächer ausgebildet.

Im weiteren Verlauf fiel der TG Spiegel des Patienten zwar ab, war mit 18 000 ng/ml jedoch noch massiv erhöht. Die Mikroheterogenität (2. Untersuchung) hatte sich jetzt dahingehend verschoben, daß die Banden bei pH 4,50 und 4,60 nun die am stärksten ausgeprägten waren. Die Bande bei pH 4,40 war schon deutlich schwächer, kaum noch abgrenzbar war die Bande mit PI 4,35.

Weil der TG-Spiegel des Patienten vier Wochen später wieder auf Werte um 30 000 ng/ml anstieg, wurde eine 2. RIT durchgeföhrt.

Nach dieser Behandlung hatte die Mikroheterogenität (3. Untersuchung) des Serum TGs wieder die stärksten Banden bei pH 4,40 und 4,50, mit noch relativ deutlichen Banden bei pH 4,35 und 4,60

Während des Verlaufes traten keine Banden auf, die nicht auch im Referenz TG enthalten sind. Die ersten beiden Untersuchungen enthielten desialisierte Anteile.

Beurteilung des Jodgehaltes

Von der 1. zur 2. Untersuchung der Mikroheterogenität kam es zu einem Abfall des Jodgehaltes (stärkeres Hervortreten der Bande mit pH 4,60, Abschwächung der Bande pH 4,40). Nach der 2. RIT stieg der Jodgehalt des Serum TGs wieder an (3. Untersuchung), was sich durch das stärkere Hervortreten der Bande mit pH 4,40 gezeigt hat.

Mikroheterogenität von desialisiertem Serum-TG

Nach Abspaltung der Neuraminsäure stellten sich keine Banden mehr mit einem niedrigeren PI als 4,60 dar. Neben der für desialisiertem TG typischen Mikroheterogenität von pH 4,60 bis 4,90 stellten sich noch zahlreiche Banden mit einem höheren PI als 4,90 dar. Wegen fehlender Referenzen in diesem pH-Bereich konnte der PI dieser Banden nicht eindeutig bestimmt werden. Diese Banden wurden bei Untersuchungen mit intrathyreoidalem TG nicht gefunden (Abb. 16).

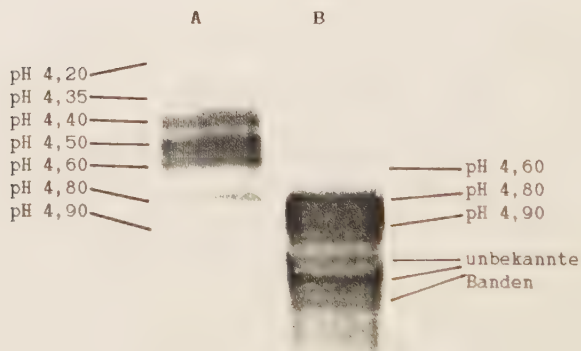


Abb. 16: Desialisiertes TG aus dem Serum eines Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom (B). A Intrathyreoidales TG und dTG zum Vergleich. Die Mikroheterogenität des Serum TG zeigte Banden mit einem höheren PI als 4,90, die beim Desialisieren von intrathyreoidalem TG nicht gefunden wurden.

1.7.2. Molekulargewichtsbestimmung von Ig aus dem Serum von Patienten mit follikularem Schilddrüsenkarzinom

Es wurde Serum Ig von zwei Patienten mit follikularem Schilddrüsenkarzinom mittels Dichtegradientengel Elektrophorese auf 4/30 PAA Gelen und anschließendem Elektroblo-
tting untersucht. Beide Igs stellten sich in jeweils nur ei-
ner Bande dar. Die Laufstrecke des extrathyreoidalen Igs war
identisch mit der des zum Vergleich auf das gleiche Gel auf-
getragenen intrathyreoidalen Igs

Wurde dem Probenpuffer, mit dem die zu untersuchenden Seren
verdünn werden, 2% SDS hinzugegeben, so stellt sich eine
zweite, niedermolekulare Bande dar

A B C D



Abb. 17:

Untersuchung von Ig aus dem Serum von zwei Patienten mit
follikularem Schilddrüsenkarzinom mittels Dichtegradienten-
gel-Elektrophorese auf 4/30 PAA Gelen und anschließendem
Elektroblo-
tting. Das extrathyreoidale TG (A;B) stellte sich
nur in einer Bande dar mit gleicher Laufstrecke wie das zum
Vergleich aufgetragene gereinigte intrathyreoidale TG
(C;D).

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der Methoden

Zur Untersuchung von extrathyreoidalem TG wurde die IEF auf 0,5 mm dicken 1%igen Agarosegelen verwendet. Mit dieser Methode ließ sich die Mikroheterogenität des Glykoproteins reproduzierbar darstellen. Um die notwendige Sensitivität und Spezifität der Methode zu erreichen, wurde die IEF mit dem Proteinblotting kombiniert. Danach ließ sich das extrathyreoidale TG nach Immobilisierung an einer Matrix mit spezifischen TG Antikörpern nachweisen.

Um ein auswertbares Ergebnis zu erzielen, war es notwendig, alle Teilmethoden des Gesamtversuchsablaufes aufeinander abzustimmen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der verschiedenen ausgetesteten Möglichkeiten zur Variation des Gesamtablaufes diskutiert.

4.1.1. IEF

Zur Ausführung einer 0,5 mm dicken Flachgel IEF stehen verschiedene Medien zur Verfügung. Die am meisten verwendeten sind das Polyacrylamid und die in dieser Arbeit benutzte Agarose.

Polyacrylamid hat gegenüber Agarose als ungeladenes Polymer den Vorteil der wesentlich geringeren Elektroosmose. Des weiteren erzielt man mit Polyacrylamid schärfere, d.h. besser differenzierbare Banden. Die Verwendungsmöglichkeit des Polyacrylamids ist jedoch wegen seiner engen Vernetzung auf kleine Proteine eingeschränkt. Eine IEF von TG auf Poly

acrylamidgelen liefert keine zufriedenstellende Auflösung (4).

Dagegen bereitet die IEF von IG auf den großporigen Agarosegelen technisch keine Schwierigkeiten. Die Elektroosmose ist bei der verwendeten Agarose so gering, daß sie das Ergebnis nicht beeinträchtigt. Ein weiterer Vorteil der Agarose besteht darin, daß die Proteine sich beim Blotten aus einem Medium mit einer großen Porenweite leichter herauslösen und auf die Nitrozellulose transferieren lassen, als aus einem sehr eng vernetzten Medium.

4.1.2. Proteinblotting

Im Verlauf von etwa 10 Jahren hat das Proteinblotting eine weite Verbreitung in Forschungs- und Routinelaboratorien erfahren. Ursache dafür sind die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten dieser Technik mit Transfer von z.B. Proteinen und Nukleinsäuren auf eine immobilisierende Matrix(34). Die Untersuchung von Bindungsaktivitäten von Proteinen mittels Antikörpern, wie in dieser Arbeit, ist sicherlich ein Schwerpunkt der Nutzung des Proteinblottings. Eine der vielen anderen Verwendungsmöglichkeiten des Blottings besteht darin, Tumorantigene nachzuweisen (17).

Die erste Beschreibung des Proteinblottings stammt aus der Molekularbiologie. 1975 beschrieb Southern eine Methode, mit der er DNA Fragmente nach Elektrophorese auf 3 mm dicken Agarosegelen auf Nitrozellulose (NZ) transferierte. Die Methode entspricht dem in dieser Arbeit beschriebenen Proteinblotting durch Puffersog. Southern nutzte die fixierte

DNA zur Hybridisierung mit RNA. Die Einführung dieser Methode hat die Analyse von DNA Fragmenten sehr erleichtert (84).

Beim Versuch, den Transfer zu quantifizieren, wurde festgestellt, daß die Menge DNA, die sich an die NZ gebunden hat, abhängig war von der Salzkonzentration des Transferpuffers. Mit höherer Salzkonzentration stieg die Menge der an der NZ gebundenen DNA (84).

Die erste Arbeit über das Elektrophoretotting von Proteinen auf Nitrozellulose erschien 1979 von Towbin et al. (89). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß ein quantitativer Transfer von Proteinen mit wesentlich geringeren Salzkonzentrationen möglich ist, als es Southern für den Transfer von DNA beschrieben hat. Auf diese Weise wird verhindert, daß es beim Elektrophoretotting zu hohen Stromwerten kommt (34).

Bei den meisten Arbeiten, bei denen die Methode des Protein Blottings verwendet wird, spielt die Frage der Effektivität des Transfers eine Rolle. Dieses wird von entscheidender Bedeutung, wenn das zu untersuchende Ausgangsmaterial nur in sehr begrenzten Mengen vorhanden ist.

In der Regel wird das Elektrophoretotting zum Erzielen guter Transferergebnisse bevorzugt (8,12,25). Es herrscht jedoch keine Einigkeit darüber, welche Zeit für einen optimalen Transfer benötigt wird. Während Rittner et al. (8) eine Stunde bei einer Spannung von etwa 10 V/cm Elektrodenabstand für ausreichend halten, hält Burnette (12) mindestens eine Transferdauer von 16 - 22 h bei vergleichbaren Bedingungen für erforderlich. Die Ergebnisse in den beiden Arbeiten wurden mit Proteinen mit einem Molekulargewicht um oder unter 100 000 g/Mol erzielt.

Um festzustellen, ob längere Elektrophoretottingzeiten den Transfer von IG aus PAA 4/30 Dichtegradientengelen erhöhen,

wurde ein Gel 17 h geblottet. Es zeigte sich kein erhöhter Transfer im Vergleich zu 5 h. Lange Transferzeiten scheinen somit keine Möglichkeit zu sein, um das Blotting von hoch molekularen Proteinen effektiver zu gestalten.

Während Bowen et al. (11) bei der Verwendung der Diffusions-Methode lange Blottingzeiten von 36-48 h beschreiben, reichen Glynn et al. (36) und Reinhard et al. (76) wesentlich kürzere Zeiten von 3 bzw. 2 h. Im Gegensatz zu Bowen, in dessen Arbeit das Blotting nach einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewandt wurde, haben Glynn und Reinhard die Diffusionsmethode mit der IEF gekoppelt. Deutlich unterscheiden sich die beiden zuletzt genannten Arbeiten jedoch in der Menge der transferierten Proteine. Während Glynn (36) einen 100 %igen Transfer von Bovinem Serum Albumin verteilt auf zwei NZ-Filter angibt, beschreibt Reinhard (76) nur einen Transfer von 35 % nach IEF von IgG. Da in beiden Arbeiten vergleichbare Methoden verwendet wurden, ist die Differenz im Transfer eventuell auf die Unterschiede in der Größe der untersuchten Proteine zurückzuführen. Dieses wurde den geringeren Transfer von Reinhard et al. erklären. Der in dieser Arbeit erzielte Transfer von über 90 % mit der Diffusions-Methode beim Blotten von TG, welches eine Größe von etwa 600.000 g/Mol hat, ist mit den vorherigen Arbeiten nicht direkt zu vergleichen, da hier Agarose als Medium für die IEF verwendet wurde. Es zeigt sich jedoch, daß die Verwendung von Agarose für die IEF beim Blotten mit der Diffusions-Methode für den Nachweis von sehr großen Molekülen einen Vorteil gegenüber dem Polyacrylamid hat.

Die Tatsache, daß die Effektivität des Transfers abhängig ist vom Molekulargewicht der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine, ist ein Hauptproblem dieser Methode. Gibson (35) schlug in einer Arbeit vor, den Transfer dadurch zu erhöhen,

indem man die zu transferierenden Proteine mit Hilfe von Proteasen in kleinere Fragmente spaltet und so die Möglichkeit eröffnet, diese leichter aus dem Gel herauslösen zu können. Die Verwendung von Proteasen bei der Puffersog Methode in dieser Arbeit brachte keinen Vorteil. Die Antigenität des IGs blieb dabei erhalten.

Ein anderer Faktor, der die Qualität des Transfers bestimmt, ist die Wahl der immobilisierenden Matrix. Am meisten verbreitet ist die auch in dieser Arbeit benutzte NZ (33). Da die NZ negativ geladen ist und die Proteine bei einem Transferpuffer um pH 8 ebenfalls eine negative Ladung aufweisen, werden eher hydrophobe Wechselwirkungen für die Immobilisierung verantwortlich gemacht als elektrostatische. Mit dem Zeta bind (ZB) wurde ein auf Nylonbasis aufgebautes positiv geladenes Filterpapier eingeführt (33). In dieser Arbeit (33) wurde experimentell festgestellt, daß das ZB zum einen eine wesentlich höhere Bindungskapazität gegenüber der NZ aufweist, zum anderen ist der Verlust von Proben durch nachfolgende Waschvorgänge beim ZB geringer. Die Bindungskapazität des ZB wird mit $480 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ BSA angegeben, die für NZ mit $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (33). Da in unserer Arbeit IG-Mengen in der Größenordnung $5-50 \text{ ng}/\text{cm}^2$ mittels Diffusion geblottet wurden, liegen wir mit dem IG noch weit unter der maximalen Bindungskapazität der NZ. Die Feststellung von Gershoni, daß die an ZB und NZ gebundenen Proteinmengen bei nur geringem Transfer nahezu identisch sind und die Verwendung von ZB somit nicht zur Erhöhung der Sensitivität dieser Methode geeignet ist (33), deckt sich mit unseren Ergebnissen, wonach die Verwendung des ZB keine Verbesserung brachte.

Der von Gershoni beschriebene Effekt, daß einmal an ZB gebundene Proteine in wesentlich geringeren Mengen durch nachfolgende Waschvorgänge wieder heruntergespült werden

als bei der NZ (33), konnte in unseren Ergebnissen nicht nachvollzogen werden. Gershoni erzielte seine Ergebnisse mit Radiojod markiertem Albumin, also einem Protein das zehnmal kleiner ist als das von uns untersuchte TG. Außerdem werden nur relative Daten angegeben, absolute Zahlen fehlen für diesen Versuch (33).

Als nachteilig hat sich eine stärkere Hintergrundanfarbung bei der Verwendung von ZB herausgestellt, die wahrscheinlich mit der erhöhten Bindungskapazität zusammenhängt.

Polvino et al. (71) beschrieben in einer Arbeit, daß sich die Nachweisgrenze für Proteine auf NZ durch die Inkubation in Glutaraldehyd deutlich verbessern läßt. Das Glutaraldehyd soll eine festere Bindung der Proteine an die NZ bewirken und so Verluste an Probenmaterial, wie sie bei den nachfolgenden Waschvorgängen auftreten, verhindern (71). Beim Nachweis von karzinoembryonalen Antigenen mittels der Dot Blotting-Methode ließ sich die Nachweisgrenze von zuvor 30 ng auf etwas weniger als 1 ng verbessern (71). Glutaraldehyd wurde in unserer Arbeit nicht ausgetestet. Allerdings lag die untere Nachweisgrenze für TG mittels Dot Blotting bei uns unter 0,5 ng und damit deutlich unter der von Polvino beschriebenen Methode.

4.1.3. Nachweisreaktionen

Voraussetzung für die Durchführung der Arbeit war, daß der erste Antikörper, Anti-TG-AK vom Meerschweinchen, die Mikroheterogenität des auf NZ transferierten TGs im gleichen Maße darstellt, wie man sie durch Anfärbung im Gel erhält. Die Ergebnisse haben gezeigt, daß der verwendete 1. AK diese Voraussetzung erfüllt hat.

Der zweite, mit FOD gekoppelte Antikörper, führte zu unspezifischen Reaktionen. Diese konnten durch Vorinkubation des Antikörpers mit TG-freiem Serum soweit verringert werden, daß sie keinen störenden Einfluß auf die Auswertung der Ergebnisse hatten.

Das Avidin/Biotin-System ermöglichte es, die Sensitivität der Methode soweit zu erhöhen, daß auch Seren von Patienten mit benignen Schilddrüsenerkrankungen mit TG-Spiegeln um 200-300 ng/ml untersucht werden konnten.

4.2. Intrathyroidales TG

In dieser Arbeit wurden zwei Isolierungsverfahren für intrathyroidales TG verwendet:

Mit der von Bechtner (4) beschriebenen Methode erhält man reines TG. TG Bruchstücke und andere Bestandteile des Eluats werden bei der Säulenchromatographie von der TG Hauptfraktion abgetrennt. Um der Frage nachzugehen, ob in den Schilddrüsen von Patienten mit Kaltem Knoten und Struma Maligna auch kleine TG-Fragmente vorliegen, wurde das Isolierungsverfahren dahingehend abgeändert, daß das Eluat aus Schilddrüsen Schnitten direkt als Probenmaterial verwendet wurde.

Das mittels Säulenchromatographie gewonnene TG aus allen aufgearbeiteten Patientenschilddrüsen ergab auf der PAA Dichtegradientengel Elektrophorese zwei Banden mit einem Molekulargewicht von 720.000 bzw. 450.000. Dieses Ergebnis weicht auffällig von der Literatur ab, nach der das aus der Schilddrüse isolierte Glykoprotein ein Molekulargewicht von 660.000 bei einem Sedimentationskoeffizienten von 19 S besitzt und aus zwei identischen Untereinheiten von 330.000 g/Mol und einem Sedimentationskoeffizienten von 12 S besteht (50,51,66). Ergebnisse aus der Molekularbiologie haben gezeigt, daß beide TG-Untereinheiten aus einer gemeinsamen mRNA übersetzt werden und somit identische Polypeptidstrukturen aufweisen (92). Nicht ganz auszuschließen sind allerdings Veränderungen während der Glykolisierung oder Jodierung, die zu geringen Differenzen zwischen den beiden Untereinheiten führen konnten (92).

Die Tatsache, daß sich das Molekulargewicht des TGs in unseren Untersuchungen, allerdings nur mit der Dichtegradientengel-Elektrophorese, von dem aus der Literatur unterscheidet, könnte an der tertiären oder quartären Struktur des TGs liegen, die sich in der elektrophoretischen Mobilität niederschlagen konnte. Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die sich mit der Frage von Konformationsänderung des TGs, wie sie z.B. durch die Jodierung ausgelöst werden, beschäftigen. Berg et al. stellten bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen fest, daß normal jodiertes TG eine ovale, niedrig jodiertes TG eine zylindrische Form aufweist (6). Intrazelluläres TG hat ebenfalls eine ovale Form (7). Es ist jedoch auch durch in vitro Oxidation möglich, die zylindrische in eine ovale Form zu überführen (6). Dem Grad der Jodierung wird ein Effekt auf die tertiäre und quartäre Form des TGs zugeschrieben. Hoch jodiertes TG hat die sterischen Voraussetzungen zur Bildung von Disulfidbrücken (42). Edelhoch et al. beschrieben eine Abnahme der -SH Gruppen bei einem Ansteigen der Jodkonzentration bis zu 0,2 % (22). Hoch jodiertem TG wird eine größere Resistenz gegen Proteasen zugeschrieben (46), während niedrig jodiertes TG sich leichter in seine Untereinheiten aufspaltet, wie die vorliegenden Ergebnisse von TG aus Schilddrüsen von Patienten aus einem endemischen Jodmangelgebiet unterstreichen. In einer neueren Arbeit konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen Jodgehalt und Konformation des TGs nicht nachvollzogen werden (16).

Die mittels Ausschüttelung aus Schilddrüsen Schnitten ohne anschließende Säulenchromatographie gewonnenen Proben ergaben bei der Untersuchung auf Dichtegradientengelen für TG aus Kalten Knoten 8 und aus Struma Maligna Gewebe 7 Banden. Die zwei verwendeten Proben hatten 5 Banden mit identischem Molekulargewicht, zwei unterschieden sich um etwa 10.000 g/Mol. Durch Proteinblotting und anschließendem Nachweis mit

spezifischen Antikörpern eines parallel gelaufenen Geles mit identischen Proben konnte festgestellt werden, daß es sich hierbei zumindest hauptsächlich um TG handelte. Wie auch auf dem direkt angefärbten Gel kam es zu einer Hintergrundanfärbung über den gesamten Molekulargewichtsgradienten. Hierbei handelte es sich wohl um Lipide und Zellmembranbestandteile, die eine saubere elektrophoretische Auftrennung und isoelektrische Fokussierung behinderten. Somit ist das Eluat aus Schilddrusenschnitten ohne weitere Bearbeitung nicht für elektrophoretische Methoden geeignet.

Für das Auftreten der zahlreichen Banden kommen zwei Erklärungen in Frage: Zum einen kann es sich um TG-Spaltprodukte handeln, die von intrazellulären Proteasen hervorgerufen wurden, zum anderen kann es sich um nicht vollständig synthetisiertes TG handeln, bedingt durch partielle Störungen in der Biosynthese von TG im Rahmen der Grunderkrankung (44,83). Die zweite Erklärung ist insofern unwahrscheinlich, als daß Untersuchungen von TG aus dem Serum von Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom auf Dichtegradientengelen nur eine Bande bei etwa 660.000 g/Mol erbracht haben. Zumindest ein Teil des TGs, welches bei Patienten mit einer Struma im Serum gefunden wird, verläßt die Schilddrüse über Nekrosen aus den Follikeln (31). Da dieser Prozeß sicherlich auf andere Erkrankungen mit pathomorphologischen Veränderungen der Schilddrüse, wie etwa Karzinome oder Kalte Knoten, übertragbar ist, wäre auch im Serum solcher Patienten niedermolekulares TG zu erwarten.

Da bekannt ist, daß gefrorene Schilddrüsen mit Proteasen kontaminiert sind (50), ist die erste Erklärung wahrscheinlicher. Die Tatsache, daß die TG-Spaltprodukte aus zwei verschiedenen Schilddrüsen nahezu identisch sind, spricht dafür, daß das TG von bestimmten in Lysosomen enthaltenen

Proteasen nur an ganz spezifischen Stellen gespalten wird (65,96). Es wird vermutet, daß dieses einen physiologischen Sinn in der Freisetzung von Schilddrüsenhormonen hat (13,43, 48,51,53,86).

4.3. Extrathyreoidales IG

Benigne Schilddrüsenerkrankungen

Es wurde IG aus dem Serum von Patienten mit Morbus Basedow (M.B.), Autoimmunthyreoiditis Hashimoto (AT), Kaltem Knoten (K.K.) und Autonomem Adenom (A.A.) auf 0,5 mm Agarosegelen und mit anschließendem Proteinblotting untersucht. Die gefundene Mikroheterogenität entsprach in allen Fällen derjenigen, die bei der IEF von reinem, aus Schilddrüsen isoliertem IG gefunden wurde (4). Die Banden erstrecken sich über einen Bereich von pH 4,20 bis pH 4,90, also dem pH Bereich von sialisiertem und desialisiertem IG. Es ließ sich keine krankheitsspezifische Mikroheterogenität feststellen. Von fünf ausgewerteten Untersuchungen von IG aus dem Serum von Patienten mit M.B. zeigten vier ausschließlich sialisiertes IG, die Mikroheterogenität erstreckte sich von pH 4,20 bis pH 4,60 mit unterschiedlicher Ausprägung der einzelnen Banden, was auf einen unterschiedlichen Jodgehalt des IGs bei den Patienten dieser Krankheitsgruppe hindeutet. Das Serum eines Patienten mit M.B. wies fast ausschließlich desialisiertes IG auf mit Banden bei pH 4,80, 4,85 und 4,90. Ganz schwach waren auch Banden im Bereich des sialisierten IGs zu erkennen, das Serum enthielt also auch geringe Mengen IG mit einem vollständigen Zuckeranteil.

Die Beurteilung des Jodgehaltes erfolgte in Anlehnung an die Ergebnisse von Bechtner über die Veränderung der Mikroheterogenität von TG nach in Vitro Jodierung. Die Seren wiesen in der Regel niedrig jodiertes TG auf, zwei Patienten dieser Untersuchungsgruppe hatten jedoch eine für hoch jodiertes TG typische Mikroheterogenität: ein Patient mit Morbus Basedow und ein Patient mit Autoimmunthyreoiditis.

Einige Arbeitsgruppen nehmen an, daß das Serum-TG von TSH kontrolliert wird (5,91). Schneider et al. beschreiben außerdem ein Ansteigen des Jodgehaltes von Serum-TG nach Stimulation mit TSH (82). Alle von uns untersuchten Patienten mit benignen Schilddrüsenerkrankungen wiesen relativ hohe TG-Spiegel auf (276 ng/ml - 1973 ng/ml). Kein Patient hatte zum Zeitpunkt der Untersuchung hohe TSH Werte. Von den Patienten mit M.B. waren zwei TSI positiv, einer mit hoch und einer mit niedrig jodiertem Serum-TG. In den von uns untersuchten Patienten ließ sich somit kein Zusammenhang zwischen TSH/TSI und dem Jodgehalt des Serum-TGs herstellen. Bei allen Patienten mit M.B. wurden in derselben Serumprobe, aus der das TG untersucht wurde, euthyreote Schilddrüsenparameter (unter thyreostatischer Therapie), gefunden. Da das Serum-TG dieser Patienten sehr unterschiedliche Jodierungsgrade aufwies, scheint kein Zusammenhang zwischen der Freisetzung von TG und Schilddrüsenhormonen zu bestehen. Dieses ist in Übereinstimmung mit Izumi und Larsen, die keine Korrelation zwischen TG-, T_4 - und T_4 -Spiegeln bei Patienten mit M.B. gefunden haben (41). So scheinen zumindest bei Schilddrüsenerkrankungen andere Faktoren als Schilddrüsenstimulation für den TG Spiegel eine Rolle zu spielen (31). Außerdem scheint der Jodgehalt des Serum TGs nicht krankheitsspezifisch zu sein.

Es wurde in zahlreichen Arbeiten versucht, Zusammenhänge zwischen Funktionsstörungen der Schilddrüse und Beeinträchtigungen der TG-Biosynthese herzustellen. Eine ausreichende Menge an intaktem TG mit einer spezifischen Aminosäuresequenz ist Voraussetzung für eine adäquate Hormonsynthese (15,45,55,77,83). Man vermutet, daß eine Veränderung der Aminosäuren zu einer Beeinträchtigung der Hormonbildung und damit zu einer Struma führen kann (19).

Dem Kohlehydratanteil wird für die Funktionstüchtigkeit des TGs eine große Bedeutung zugeschrieben (23). Die vorliegenden Ergebnisse über TG aus dem Serum eines Patienten mit K.K. decken sich mit Ergebnissen aus der Literatur, wonach intrathyreoidales TG aus einem K.K. weniger Kohlehydrate und weniger Jod enthält als TG aus einem heißen Knoten (61). Da die Thyreozyten jedoch in der Lage sind, TG zu jodieren, nimmt man an, daß das TG wegen des fehlenden Zuckeranteils den Ort der Jodierung nicht erreichen kann (61). Nach Ergebnissen von Monaco et al. bei experimentellen Schilddrüsentumoren scheint dabei die endständige Neuraminsäure eine wichtige Rolle zu spielen.

Bei dem Patienten mit M.B., der fast ausschließlich desialisiertes TG im Serum enthielt, lagen zum Untersuchungszeitpunkt unter thyreostatischer Therapie Normalwerte für T_3 und T_4 vor. Da die Mikroheterogenität des TGs auf einen niedrigen Jodgehalt hindeutete und desialisiertes TG als beeinträchtigt in der Jodierung und damit in der Hormonbildung angesehen wird, ist es wahrscheinlich, daß TG und Schilddrüsenhormone aus einem getrennten Pool und über verschiedene Wege freigesetzt werden (5).

Ebenfalls ließ sich kein Zusammenhang zwischen thyreostatischer Therapie auf der einen und dem Jodgehalt und dem Neuraminsäuregehalt des extrathyreoidalen TGs auf der anderen Seite feststellen. Hoch jodiertes TG trat sowohl unter Therapie wie auch ohne Therapie auf, ebenso verhielt es sich mit normal sialisiertem und desialisiertem TG.

Maligne Schilddrüsenerkrankungen

Bei Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen wird eine Thyreodektomie und anschließend eine ablative Radiojodtherapie (RJT) durchgeführt (75). Damit wird sämtliches TG-produzierende Gewebe entfernt, es darf kein TG im Serum nachweisbar sein. Die Metastasen des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms sind in der Lage TG zu synthetisieren. Da sie dieses jedoch nicht in Follikeln speichern, sondern in die Zirkulation abgeben, ist ein Ansteigen des Serum-TGs ein sehr signifikanter Hinweis für eine Neumanifestation der Erkrankung (37,69,70,72,75,80). Dieses soll auch bei nicht speichernden Metastasen der Fall sein (79). Das Serum-TG dieser Patienten bietet eine Möglichkeit, aus maligne entarteten Zellen synthetisiertes TG zu untersuchen, da keine natürlichen TG Bildungsorte mehr vorhanden sind.

Auch das undifferenzierte Schilddrüsenkarzinom ist in der Lage, geringe Mengen niedrig jodiertes, teils desialisiertes 19 S TG zu synthetisieren (64). An einem experimentellen Schilddrüsentumor bei der Ratte haben Monaco et al. festgestellt, daß eine eingeschränkte Aktivität der Sialyltransferase zu einem verminderten Einbau von Neuraminsäure führt. Dieses wiederum behindert die Freisetzung von TG in das Follikellumen, was ein niedrig jodiertes TG zur Folge hat (59,63). Unterstützt werden die Ergebnisse von Schneider et al., die niedrig jodiertes TG im Serum von Patienten mit

differenziertem Schilddrüsenkarzinom gefunden haben (81). Noch relativ unklar ist, auf welchem Weg das TG bei Schilddrüsenkarzinomen die Zirkulation erreicht. Eine Einzelfalluntersuchung beschreibt, wie große Mengen jodiertes TG aus Follikeln einer maligne entarteten Schilddrüse in umliegende Lymphgefäße gelangen kann (32).

Die vorliegenden Untersuchungen von fünf Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom ergaben weder bei den vier Patienten, von denen Einzeluntersuchungen vorliegen, noch bei dem Patienten, bei dem die Mikroheterogenität während einer Radiojodtherapie beobachtet wurde, Hinweise auf eine krankheitsspezifische Mikroheterogenität:

Zwei der vier Einzeluntersuchungen wiesen desialisiertes und niedrig jodiertes sialisiertes TG auf, was in Übereinstimmung mit der Literatur ist. Nicht übereinstimmend sind jedoch die Ergebnisse der anderen zwei Fälle, die hoher jodiertes, sialisiertes TG ohne Hinweise auf desialisierte Anteile hatten. Auch die Ergebnisse der Dichtegradientengel-Elektrophorese, bei der sich Serum-TG von zwei Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom nur mit einer Bande mit einem Molekulargewicht von etwa jeweils 720.000 dargestellt hat, spricht dagegen, daß Serum TG bei diesen Patienten generell niedrig jodiert ist, da niedrig jodiertes TG die Tendenz hat, sich in seine zwei 12 S Untereinheiten aufzuspalten.

Eine Verlaufsbeobachtung während einer Radiojodtherapie hat gezeigt, daß sich die Mikroheterogenität im Verhältnis zum Jodgehalt auch bei Serum TG von Patienten mit Schilddrüsenkarzinom ändern kann. Man nimmt an, daß zwischen der physiologischen Konformationsänderung des TGs, die während der Jodierung stattfindet und der Veränderung der Mikroheterogenität von TG bei der IEF, die man während der *in vitro* Jodierung beobachten kann, ein Zusammenhang besteht (4). Danach wäre TG aus dem Serum dieser Patientengruppe in der

Lage, mittels Jodierung seine Konformation zu ändern, einem Vorgang, dem eine Rolle in der Freisetzung der Schilddrüsenhormone zugesprochen wird (48,53).

Bei einem Patienten wurde die endständige Neuraminsäure vom Serum-TG abgetrennt. Neben der für desialisiertes TG spezifischen Mikroheterogenität zeigten sich weitere Banden mit höheren PI Werten. Dieses Ergebnis konnte für weitergehende Veränderungen am Kohlehydratanteil des TGs auch bei follikulärem Schilddrüsenkarzinom sprechen, wie es bei Monaco et al beschrieben ist (94,95).

Die Untersuchungen zeigten, daß es keine für ein follikuläres Schilddrüsenkarzinom spezifische Mikroheterogenität des Serum-TGs gibt. Sämtliche Banden deckten sich mit denen von intrathyreoidalem TG, welches aus OP-Material isoliert und als Vergleichsprobe eingesetzt wurde.

5. Zusammenfassung

Experimente mit gereinigtem intrathyreoidalen Thyreoglobulin (TG), welches aus humanem Operationsmaterial gewonnen wurde, haben gezeigt, daß Jod- und Neuraminsäuregehalt des Moleküls die Mikroheterogenität von TG in der isoelektrischen Fokussierung (IEF) beeinflussen; d.h. umgekehrt, daß aus dem Bandenmuster des TGs bei der IEF sekundär auf Jod- und Neuraminsäuregehalt geschlossen werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu erarbeiten, die es erlaubte, auch die Mikroheterogenität von extrathyreoidalem, zirkulierendem TG mit der IEF zu untersuchen, um sie mit der bekannten Mikroheterogenität von intrathyreoidalem TG vergleichen zu können. Dazu war es erforderlich, die Sensitivität der Methode um den Faktor 10^4 zu verbessern, da mit TG-Mengen von 1 ng – 5 ng je Probe gearbeitet werden mußte, im Gegensatz zu 25 µg, die bei der Untersuchung von intrathyreoidalem TG eingesetzt werden konnten. Diese Sensitivität des TG Nachweises wurde erreicht, indem die IEF mit dem Proteinblotting kombiniert wurde. Dazu wurde das TG nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine immobilisierende Matrix transferiert, auf der es dann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden konnte. Damit wurde auch gleichzeitig eine ausreichende Spezifität erzielt, die es ermöglichte, Serum direkt als Probenmaterial ohne vorhergehende Isolierungsschritte einzusetzen.

Die erarbeitete Methode erlaubt es, die Mikroheterogenität von TG bis zu einer Ausgangsmenge von 1 ng darzustellen. Das entspricht bei einem Auftragungsvolumen der Proben von 5 µl einer Ausgangskonzentration von 200 ng/ml TG im Serum. Es war nicht möglich, mit dieser Methode das TG aus dem Serum von Personen mit Normalwerten um 10 ng/ml zu untersuchen.

Die Mikroheterogenität von TG aus dem Serum von Patienten mit Morbus Basedow, Autoimmunthyreoiditis, Autonomem Adenom und Kalten Knoten zeigten das aus Untersuchungen mit intrathyreoidalem TG bekannte Bandenmuster. Die Beurteilung des Jodgehaltes mit Hilfe der Mikroheterogenität ergab, daß fast sämtliche untersuchten Patienten mit benignen Schilddrüsenerkrankungen niedrig jodiertes Serum-TG hatten. Da bei einem Patienten mit Morbus Basedow unter thyreostatischer Behandlung und einem mit Autoimmunthyreoiditis ein für hoch jodiertes TG typisches Bandenmuster nachgewiesen werden konnte, war das im Blut zirkulierende TG jedoch nicht grundsätzlich niedrig jodiert, wie es von Schneider et al. beschrieben wurde (81).

Die Patienten mit Morbus Basedow hatten mit Ausnahme eines Patienten vollständig sialisiertes TG, dieser eine Patient zeigte fast nur desialisiertes TG. Das TG aus dem Serum der Patienten mit den anderen benignen Schilddrüsenerkrankungen zeigte in seiner Mikroheterogenität vorwiegend sialisiertes TG, daneben aber auch desialisierte Anteile.

Auch die Patienten mit follikularem Schilddrüsenkarzinom zeigten keinen einheitlichen Jodierungsgrad des Serum-TGs, es wurden sowohl Bandenmuster für hoch, als auch für niedrig jodiertes TG gefunden. Ebenso wie bei den Patienten mit benignen Schilddrüsenerkrankungen wurde hier auch kein krankheitsspezifisches Bandenmuster des TGs gefunden. Die Mikroheterogenität zeigte ausschließlich Banden, die aus Untersuchungen mit intrathyreoidalem TG bekannt sind. Von den 5 Patienten dieser Krankheitsgruppe hatten drei Patienten neben den normal sialisierten Anteilen auch desialisiertes TG, die anderen zwei hatten nur sialisierte Anteile.

Bei einem Patienten mit follikularem Schilddrüsenkarzinom fand sich nach Desialisieren des Serum-TGs in vitro mit Neuraminidase nicht nur die für desialisiertes TG typische Mikroheterogenität sondern darüber hinaus Banden im alka-

lischen Bereich, die aus Experimenten mit intrathyreoidalem TG nicht bekannt waren. Dieses spricht für eine pathologische Veränderung des TG Moleküls bei diesem Tumorpatienten.

Bei zwei Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom, die extrem hohe TG-Spiegel von 66.500 und 37.000 ng/ml aufwiesen, konnte mit der Polyacrylamid-Dichtegradientengelelektrophorese das Molekulargewicht des Serum-TGs bestimmt werden. Dabei stellte sich dieses TG bei beiden Patienten in nur einer Bande dar und hatte eine identische Laufstrecke wie das zum Vergleich untersuchte normale intrathyreoidale TG. Demnach lag das im Blut zirkulierende TG dieser Patienten hauptsächlich in der intakten Form mit einem Molekulargewicht von 660 000 vor.

6. LITERATUR

1. ARIMA, T., SPIRO, M.J., SPIRO, R.G.
Studies on the Carbohydrate Units of Thyroglobulin
Evaluation of their Microheterogeneity in the Human and
Calf Proteins
1972 J. Biol. Chem. 247, 1825
2. ARIMA, T., SPIRO, R. G.
Studies on the Carbohydrate Units of Thyroglobulin
1972 J. Biol. Chem. Vol. 247, 1836
3. AVVEDIMENTO, V., E., TRAMONTANO, D., URSINI, M., V.,
MONTICELLI, A., DI LAURO, R.
The Level of Thyroglobulin mRNA is Regulated by TSH both
in Vitro and in Vivo
1984 Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 122, 472
4. BECHTNER, G.
Charakteristische Veränderungen der Mikroheterogenität
von Humanem Thyreoglobulin in Abhängigkeit von
unterschiedlichem Jod- und Sialinsäuregehalt
1986 Dissertation, München
5. BELFIORE, A., RUNELLO, F., SAVA, L., LA ROSA, G.,
VIGNERI, R.
Thyroglobulin Release after Graded Endogenous
Thyrotropin Stimulating in Man: Lack of Correlation
with Thyroid Hormone Response
1984 J. Clin. Endocrinol. Metab., 59, 974
6. BERG, G., BJORKMAN, U., EKHOLM, R.
Conformational Change of the Thyroglobulin Molecule
Induced by Oxidation in Vitro
1979 Molec. Cell. Endocrinol., 17, 139
7. BERG, G., BJORKMAN, U., EKHOLM, R.
The Structure of Newly Synthesized Intracellular
Thyroglobulin Molecules
1980 Mol. Cell. Endocrinol., 20, 87
8. BITTNER, M., KUPFERER, P., MORRIS, C. F.
Electrophoretic Transfer of Proteins and Nucleic Acids
from Slab Gels to Diazobenzylloxymethyl Cellulose or
Nitrocellulose Sheets
1980 Anal. Biochem. 102, 459
9. BJORKMAN, U., EKHOLM, R., ELMQIST, L.-G., ERICSON, L. E.,
MELANDER, A., SMEDS, S.
Induced Unidirectional Transport of Protein into the
Thyroid Follicular Lumen
1974 Endocrinol., 95, 1506

10. BJORKMAN, U., EKHOLM, R., ERICSON, L.E.
Effects of Thyrotropin on Thyroglobulin Exocytosis and Iodination in the Rat Thyroid Gland
1978 *Endocrinology*, 102, 460
11. BOWEN, B. STEINBERG, J., WEINTRAUB, H.
The Detection of DNA Binding Proteins by Protein Blotting
1980 *Vol. Nuc. Acid. Resear.*, 8, 1
12. BURNETTE, W., N.
"Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins From Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A
1981 *Anal. Biochem.* 112, 195
13. CHERNOFF, S., B., RAWITCH, A., B.
Thyroglobulin Structure Function: Isolation and Characterization of a Thyroxine-Containing Polypeptide from Bovine Thyroglobulin
1981 *J. Biol. Chem.* Vol. 256, 9425
14. DE CROMBRUGGHE, B., FITT RIVERS, R., EDELHOCH, H.
The Properties of Thyroglobulin
XI. The Reduction of Disulfide Bonds
1966 *J. Biol. Chemist.* Vol. 241, 2766
15. CZERNICHOV, P., SCHLUMBERGER, M., POMAREDE, R., FRAGU, P.
Plasma Thyroglobulin Measurements Help Determine the Type of Thyroid Defect in Congenital Hypothyroidism
1983 *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56, 242
16. DELAIN, F., AQUANI, A., VIGNAL, A., COUURE TOSI, F., HOVSEPIAN, S., FAYEL, G.
The Structure of Tissue on Cell Culture Extracated Thyroglobulin is Independent of its Iodine Content
1987 *Mole. Cell. Endocrinol.*, 49, 173
17. DUROIS, D. B., ROSSEN, R. D.
Use of Human Antibodies to Identify Antigens in Cultured Human Tumor Cells: Detection of Discrete Antigen Molecules Using Electroblothing and Enzyme-Antibody Probes
1983 *J. Immunol. Methods*, 63, 7
18. DUNN, J. I.
The Amino Acid Neighbors of Thyroxine in Thyroglobulin
1970 *J. Biol. Chem.* Vol. 245, 5954

19. DUNN, J. T., RAY, S. C.
Variations in the Structure of Thyroglobulins from
normal and Goitrous Human Thyroids
1978 J. Clin. Endocrinol. Metab., 47, 861
20. DUNN, J. T., DUNN, A. D., HEPPNER, D. G., KIM, P. S.
A Discrete Thyroxine Rich Iodopeptide of 20,000 Daltons
from Rabbit Thyroglobulin
1981 J. Biol. Chem. Vol. 256, 942
21. DUNN, J. T., KIM, P. S., DUNN, A. D.
Favorite Sites for Thyroid Hormone Formation on the
Peptide Chains of Human Thyroglobulin
1982 J. Biol. Chem. Vol. 257, 88
22. EDELHOCH, H., CARLOMAGNO, M. S., SALVATORE, G.
Iodine and Structure of Thyroglobulin
1969 Archiv. Biochem. Biophys. 134, 264
23. EGGO, M. C., BURKOW, G. N.
Glycosylation of Thyroglobulin - Its Role in Secretion,
Iodination and Stability
1983 Endocrinol. Vol. 113, 1655
24. EKHOLM, R., WOLLMAN, S. H.
Site of Iodination in the Rat Thyroid Gland Deduced
from Electron Microscopic Autoradiographs
1975 Endocrinology, 97, 1432
25. ELKON, K. B., JANKOWSKI, P. W., JIA-LI CHU
Blotting Intact Immunoglobulins and Other High Molecular
-Weight Proteins after Composite Agarose Polyacrylamid
Gel Electrophoresis
1984 Anal. Biochem. 140, 208
26. ERICSON, L. E., KING, K. M., OFVERHOLM, T.
Selective Macropinocytosis of Thyroglobulin in Rat
Thyroid Follicles
1983 Endocrinol., 113, 1746
27. FENZI F., CECCARELLI C., MACCHIA, E., MONZANI, F.,
BARTALENA, L., GIANI, C., CECCARELLI, C., LIPPI, F.,
BASCHIERI, F., PINCHERA, A.
Reciprocal Changes of Serum Thyroglobulin and TSH in Re
sidents of a Moderate Endemic Goitre Area
1985 Clin. Endocrinol. 23, 115
28. FOUCHIER, F., MEGO, J. L., DANG, J., SIMON, C.
Intralysosomal Hydrolysis of Thyroglobulin
I. Modulation by Lysosomal Membrane Permeability and
Exogenous Factors
1983 Act. Endocrinol. 103, 53

29. FOUCHIER, F., MEGO, J. L., DANG, J., SIMON, C.
Intralysosomal Hydrolysis of Thyroglobulin
II. Different Fates of Poorly and Fully Iodinated TG and
Specific Activation by TSH of the Degradation of Fully
Iodinated TG
1983 Act. Endocrinol., 103, 62
30. GARINER, R., HAINZINGER, A., HORN, K., PICKARDT, R.C.
Evidence for Autonomous Thyroglobulin Release from
Euthyroid and Hyperthyroid Nodular Goiter-Thyroglobulin,
a Possible Helpful Parameter in Diagnosis of
Non malignant Thyroid Disorders
1983 Klin. Wochenschr., 61: 737
31. GEREL, F., RAMELLI, F., BÜRG, U., INGOLD, U.,
STUDER, H., WINAND, R.
The Site of Leakage of Intrafollicular Thyroglobulin
into the Bloodstream in Simple Human Goiter
1983 J. Clin. Endocrinol. Metab. Vol. 57, 915
32. GEBEL, F., STUDER, H.
Malignant Follicles of a Differentiated Thyroid
Carcinoma Releasing Iodinated Thyroglobulin into
the Lymphatic Vessels
1984 Clin. Endocrinol. 20, 457
33. GERSHONI, J. M., PALADE, G. E.
Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium
Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels to a Positively
Charged Membrane Filter
1982 Anal. Biochem. 124, 396
34. GERSHONI, J. M., PALADE, G. E.
Protein Blotting: Principles and Applications
1983 Anal. Biochem. 131, 1
35. GIBSON, W.
Protease Facilitated Transfer of High Molecular Weight
Proteins during Electrophoretic Transfer to Nitrocellulose
1981 Anal. Biochem. 118, 1
36. GLYNN, F., GILBERT, H., NEWCOMBE, J., CUZNER, M., L.
Rapid Analysis of Immunoglobulin Isoelectric Focusing
Patterns with Cellulose Nitrate Sheets and
Immunoperoxidase Staining
1982 J. Immunol. Methods, 51, 251
37. VAN HERLE, A. J., ULLER, R. T.
Elevated Serum Thyroglobulin
A Marker of Metastases in Differentiated Thyroid
Carcinomas
1975 J. Clin. Invest., 56, 272

38. Van Herle, A. J., Vassart, G., Dumont, J. E.
Control OF Thyroglobulin Synthesis and Secretion
a. Vol. 301 No. 5, 239-249, (First of two Parts)
b. Vol. 301 No. 6, 307-314, (Second of two Parts)
1979 N. Eng. J. Med.
39. VAN HÈRLE, A. J., VAN HERLE, I. S., GREIPEL, M. A.
An International Cooperative Study Evaluating Serum
Thyroglobulin Standards
1985 J. Clin. Endocrinol. Metab., 60, 338
40. VAN DE HOVE-VANDENBROUCKE, M.-F.
Secretion of Thyroid Hormones
in: De Visscher, The Thyroid Gland
1980 Raven Press, New York, 61-79
41. IZUMI, M., LARSEN, P. R.
Correlation of Sequential Changes in Serum Thyroglobulin
Triiodothyronine, and Thyroxine in Patients with Graves
Disease and Subacute Thyroiditis
1978 Metabolism, 27, 449
42. DI JESU, B., FORMISANO, S., PALUMBO, G.
Cross-Linking with Dimethylsuberimide to Study
Thyroglobulin Confirmation
1985 Biochem. Biophys. Resear. Commun. Vol. 127, 37
43. KIM, P. S., DUNN, J. T., KAISER, D. L.
Similar Hormone Rich Peptides from Thyroglobulins of
five Vertebrate Classes
1984 Endocrinology Vol. 114, 369
44. KOHNO, Y., TARUTANI, O., SAKATA, S., NAKAJIMA, H.
Monoclonal Antibodies to Thyroglobulin Elucidate
Differences in Protein Structure of Thyroglobulin in
Healthy Individuals and those with Papillary
Adenocarcinoma
1985 J. Clin. Endocrinol. Metab. 61, 343
45. LAMAS, L., TAUROG, A.
The Importance of Thyroglobulin Structure of Thyroid
Peroxidase-Catalyzed Conversion of Diiodotyrosine
to Thyroxine
1977 Endocrinology, 100, 1129
46. LAMAS, L., INGBAR, S. H.
The Effect of Varying Iodine Content on the
Susceptibility of Thyroglobulin to Hydrolysis by
Thyroid Acid Protease
1978 Endocrinol., 102, 188

47. DI LAURO, R., OBICI, S., CONDLIFFE, D., URSINI, V. M., MUSTI, A., MOSCATELLI, C., AVVEDIMENTO, V. E.
The Sequence of 267 Amino Acids at the Carboxyl-End of Rat Thyroglobulin
1985 Eur. J. Biochem. 148, 7
48. LEJEUNE, P.-J., MARRIQ, C., ROLLAND, M., LISSITZKY, S.
In Vitro and in Vivo Iodination of Human Thyroglobulin in Relation to Hormone Release
1983 FEBS 156, 77
49. LEJEUNE, P. J., MARRIQ, C., ROLLAND, M., LISSITZKY, S.
Amino Acid Sequence around a Hormonogenic Tyrosin Residue in the N Terminal Region of Human Thyroglobulin after in Vivo and in Vitro Iodination
1983 Biochem. Biophys. Resear. Commun. Vol. 114, 73
50. S. LISSITZKY
Thyroglobulin Entering into Molecular Biology
Review Article
1984 J. Endocrinol. Invest. 7, 65
51. MARRIQ, C., ARNAUD, C., ROLLAND, M., LISSITZKY, S.
An Approach to the Structure of Thyroglobulin Hormone-Forming Sequences in Porcine Thyroglobulin
1980 Eur. J. Biochem. 111, 33
52. MARRIQ, C., ROLLAND, M., LISSITZKY, S.
Amino Acid Sequence of the Unique 3,5,3'-Triiodothyronine Containing Sequence from Porcine Thyroglobulin
1983 Biochem. Biophys. Resear. Commun. Vol. 112, 206
53. MARRIQ, C., LEJEUNE, P.-J., MATHIEFY, Y., ROLLAND, M., LISSITZKY, S.
Precursor-Product Relationship between the 26-kDa and 18 kDa Fragments Formed by Iodination of Human Thyroglobulin
1984 FEBS Vol. 175, 140
54. MAURIZIS, J.-C., MARRIQ, C., ROLLAND, M., LISSITZKY, S.
Thyroid Hormon Synthesis and Reactivity of Hormone Forming Tyrosine Residues of Thyroglobulin
1981 FEBS Vol. 132, 29
55. MEDeiros NETO, G. A., KNOBEL, M., CAVALIERE, H., SIMONELLI, J., MATTAR, E.
Hereditary Congenital Goitre with Thyroglobulin Deficiency Causing Hypothyroidism
1984 Clin. Endocrinol., 20, 631

56. MERCKEN, L., SIMONS, M. J., VASSART, G.
The 5'-End of Bovine Thyroglobulin mRNA Encodes a
Hormonogenic Peptide
1982 FEBS Vol. 149, 285
57. MERCKEN, L., MASSAER, L., SIMONS, M.-J., SWILLENS, S.,
VASSART, G.
Identification of Hormonogenic Domains in the Carboxyl
Terminal Region of Bovine Thyroglobulin
1984 Biochem. Biophys. Resear. Commun. Vol. 125, 901
58. MIQUELIS, R., SIMON, C.
In Vivo Sequential Model for Thyroglobulin Iodination
1980 Act. Endocrinol. 95, 489
59. MONACO, F., ROBBINS, J.
Defective Thyroglobulin Synthesis in an Experimental
Rat Thyroid Tumor
1973 J. Biol. Chem. Vol. 248, 2328
60. MONACO, F., ROBBINS, J.
Incorporation of N Acetylmannosamine and
N-Acetylglucosamine into Thyroglobulin in Rat
Thyroid in Vitro
1973 J. Biol. Chem. Vol. 248, 2072
61. MONACO, F., MONACO, G., ANDREOLI, M.
Thyroglobulin Biosynthesis in "Cold" and "Hot" Nodules
in the Human Thyroid Gland
1975 J. Clin. Endocrinol. Metab. Vol. 41, 253
62. MONACO, F., SALVATORE, G., ROBBINS, J.
The Site of Sialic Acid Incorporation into Thyroglobulin
in the Thyroid Gland
1975 J. Biol. Chem. Vol. 250, 1595
63. MONACO, F., GRIMALDI, S., DOMINICI, R., ROBBINS, J.
Defective Thyroglobulin Synthesis in an Experimental Rat
Thyroid Tumor: Iodination and Thyroid Hormone Synthesis
in Isolated Tumor Thyroglobulin
1975 Endocrinol. Vol. 97, 347
64. MONACO, F., CARDUCCI, C., DE LUCA, M., ANDREOLI, M.,
DOMINICI, R.
Human Undifferentiated Thyroid Carcinoma Synthesizes and
Secretes 19 S Thyroglobulin
1984 Cancer, 54, 79
65. NAKAGAWA, H., OHTAKI, S.
Thyroxine Release from Thyroglobulin and its
T₄-Containing Peptide by Thyroid Thiol Proteases
1985 Endocrinology, 116, 1433

66. DE NAYER, P., VASSART, G.
Structure and Biosynthesis of Thyroglobulin
in: *The Thyroid Gland*, 21-38
1980 Raven Press, New York
67. NUNEZ, J.
Iodination and Thyroid Hormone Synthesis
in: *The Thyroid Gland*, 39-60
1980 Raven Press, New York
68. ÖFVERHOLM, T., ERICSON, L.E.
Intraluminal Iodination of Thyroglobulin
1984 *Endocrinology* 114, 827
69. PACINI, F., PINCHERA, A., GIANI, C., GRASSO, L.,
BASCHIERI, L.,
Serum Thyroglobulin Concentrations and ¹³¹I Whole Body
Scans in the Diagnosis of Metastases from Differentiated
Thyroid Carcinoma (After Thyroidectomy)
1980 *Clin. Endocrinol.*, 13, 107
70. PACINI, F., PINCHERA, A., GIANI, C., GRASSO, L.,
DOVERI, F., BASCHIERI, L.
Serum Thyroglobulin in Thyroid Carcinoma and other
Thyroid Disorders
1980 *J. Endocrinol. Invest.*, 3, 283
71. POLVINO, W. J., SARAVIS, C. A., SAMSON, C. E.,
COOK, R. R.
Improved Protein Analysis on Nitrocellulose Membranes
1983 *Electrophoresis*, 4, 368 - 369
72. L. RAMANNA, A. D. WAXMAN, M. B. BRACHMAN, N. SENSEL,
D. E. IANASESCU, D. S. BERMAN, R. CAIZ, G. D. BRAUNSTEIN
Correlations of Thyroglobulin Measurements and Radio -
iodine Scans in the Follow Up of Patients With Differen -
tiated Thyroid Carcinoma
1985 *Cancer*, Vol. 55, 1525
73. RAWITCH, A. B., CHERNOFF, S. B., LIIWER, M. R.,
ROUSE, J. B., HAMILTON, J. W.
Thyroglobulin Structure - Function
The Amino Acid Sequence Surrounding Thyroxine
1983 *J. Biol. Chem.* Vol. 258, 23
74. RAWITCH, A. B., LIIWER, M. R., GREGG, I., TURNER, C.
D. ROUSE, J. B., HAMILTON, J. W.
The Isolating of Identical Thyroxine Containing Amino
Acid Sequences from Bovine, Ovine and Porcine Thyro -
globulins
1984 *Biochem Biophys. Resear. Commun.* Vol. 118, 423

-
75. REINERS, C., REIMANN, J., SCHAFFER, R., BAUM, K., BECKER, W., EILLES, C., GERHARDS, W., SCHICK, F., SPIEGEL, W., WIEDEMANN, W., BORNER, W.
Das Metastasierende Differenzierte Schilddrüsenkarzinom
1984 Fortschr. Röntgenstr. 141, 306
76. REINHART, M., P., MALAMUD, D.
Protein Transfer from Isoelectric Focusing Gels: The Nativ Blot
1982 Anal. Biochem. 123, 229
77. RIESCO, G., BERNAL, J., SANCHEZ-FRANCO, F.
Thyroglobulin Defect in a Human Congenital Goiter
1974 J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol. 38, 33
78. ROGER, P., P., VAN HEUVERSWEYN, B. LAMBERT, C., REUSE, S., VASSART, G., DUMONT, J., E.
Antagonistic Effects of Thyrotropin and Epidermal Growth Factor on Thyroglobulin mRNA Level in Cultured Thyroid Cells
1985 Eur. J. Biochem. 152, 239
79. SCHLUMBERGER, M., CHARBORD, P., FRAGU, P., LUMBROSCO, J. PARMENTIER, C., TUBIANA, M.
Circulating Thyroglobulin and Thyroid Hormones in Patients with Metastases of Differentiated Thyroid Carcinoma: Relationship to Serum Thyrotropin Levels
1980 J. Clin. Endocrinol. Metab., 51, 513
80. SCHLUMBERGER, M., FRAGU, P., PARMENTIER, C., TUBIANA, M.
Thyroglobulin Assay in the Follow-Up of Patients with Differentiated Thyroid Carcinomas: Comparison of its Value in Patients with or without Normal Residual Tissue
1981 Act. Endocrinol., 98, 215
81. SCHNEIDER, A., IKEKUBO, K., KUMA, K.
Iodine Content of Serum Thyroglobulin in Normal Individuals and Patients with Thyroid Tumors
1983 J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol 57, 1251
82. SCHNEIDER, A., FLEISCHMANN, K., CHU, L.
Thyrotropin Increases the Iodine Content of Rat Circulating Thyroglobulin as Measured by Equilibrium Density Gradient Centrifugation
1985 Biochem. Biophys. Acta 838, 329
83. SILVA, J.E., SANTELICES, R., KISHIHARA, M., SCHNEIDER, A.
Low Molecular Weight Thyroglobulin Leading to a Goiter in a 12-Year Old Girl
1984 J. Clin. Endocrinol. Metab., 58, 526

84. SOUTHERN, E. M.
Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments
Separated by Gel Electrophoresis
1975 J. Mol. Biol. 98, 503
85. SPIRO, M. J.
Studies on the Protein Portion of Thyroglobulin
1970 J. Biol. Chem. Vol. 245, 5820
86. SPIRO, M. J.
Subunit Heterogeneity of Thyroglobulin
1973 J. Biol. Chem. Vol. 248, 4446
87. SPIRO, M., J.
Presence of a Glucuronic Acid-Containing Carbohydrate
Unit in Human Thyroglobulin
1977 J. Biol. Chem. Vol. 252, 5424
88. STUDER, H., VON GRÜNIGEN, C., HAERPELI, A., KOHLER, H.,
ROTHLISBERGER, M., GERRER, H.
Iodination of Thyroglobulin Molecules Depends on their
Diffusion Velocity in Follicular Colloid
1986 Mol. Cell. Endocrinol. 45, 91
89. TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J.
Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacryl
amid Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some
Applications
1979 Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 76, 4350
90. TSUII, T., YAMAMOTO, K., IRIMURA, I., OSAWS, T.
Structure of Carbohydrate Unit A of Porcine
Thyroglobulin
1981 Biochem J. 195, 691
91. UNGER, J., VAN HEUERSWYN, B., DECOSTER, C., MOCKEL, J.,
VAN HERLE, A.
Thyroglobulin and Thyroid Hormon Release after Intra
venous Administration of Bovine Thyrotropin in Man
1980 J. Clin. Endocrinol. Metab. Vol. 51, 590
92. VASSART, G., BACOLLA, A., BROCCAS, H., CHRISTOPHE, D.,
DE MARTYNOFF, G., LERICHE, A., MERCKEN, L., FARMA, J.,
FARGOVNIK, H., VAN HEUERSWYN, B.
Structure, Expression and Regulation of the
Thyroglobulin Gene
1985 Mol. Cell. Endocrinol. 40, 89
93. YAMAMOTO, K., TSUII, T., IRIMURA, I., OSAWA, T.
The Structure of Carbohydrate Unit B of Porcine
Thyroglobulin
1981 Biochem. J. 195, 701

94. YAMAMOTO, K., TSUJI, T., TARUTANI, O., OSAWA, T.
Structural Changes of Carbohydrate Chains of Human
Thyroglobulin Accompanying Malignant Transformation
of Thyroid Glands
1984 Eur. J. Biochem. 143, 133
95. YAMAMOTO, K., TSUJI, T., TARUTANI, O., OSAWA, T.
Phosphorylated High Mannose-Type and Hybrid Type
Oligosaccharide Chains of Human Thyroglobulin Isolated
from Malignant Thyroid Tissue
1985 Biochim. Biophys. Acta 838, 84
96. YOSHINARI, M., TAUROG, A.
Lysosomal Digestion of Thyroglobulin: Role of Cathepsin
D and Thiol Proteases
1985 Endocrinology 117, 1621

7. LEBENS LAUF

NAME: Christoph Jürgens

GEBURTSDATUM: 4. April 1957

GEBURTSORT: Berlin Wilhelmsruh

ELTERN: Dr. med. Rolf Jürgens, Radiologe
Mercedes Jürgens, geb. Weyer

SCHULE:

1964-1968: Grundschule, Mühlflussschule in Kiel

1968-1978: Gymnasium, Humboldt-Schule in Kiel

WEHRDIENST:

Okt. 1978 Mai 79: Grundwehrdienst bei der Marine

STUDIUM:

1979-1985: Studium der Humanmedizin an der
Ludwig Maximilians Universität
in München

DOKTORARBEIT:

Beginn mit meiner Doktorarbeit im
Mai 1983 bei Herrn Prof. Dr. Horn,
Medizinische Klinik Innenstadt,
Endokrinologische Abteilung (Frau
Prof. Dr. med. C.R. Pickardt)

APPROBATION: 13. November 1985

ZIVILDIENTST:

März 1986 März 1987: Zivildienst als Arzt in der Röntgenabteilung des Klinikums Rechts der Isar, Prof. Dr. P. Gerhardt

